



00346 11
24.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTO DE LA HISTERINA SOBRE EL
CRECIMIENTO Y NIVELES DE PEROXIDASAS
(EC. 1.11.1.7.) EN CALLOS INDUCIDOS DE
Phaseolus vulgaris L.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
MONICA ADRIANA TORRES RAMOS

DIRECTOR DE TESIS.
M. EN C. JAVIER ANTONIO TABOADA RAMIREZ

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A la memoria de mi padre

Armando Torres

y

A mi madre por todo su apoyo y cariño

Gloria Ramos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma muy especial a mis tutores por su paciencia , consejos y confianza.

M. en C. Javier Antonio Taboada Ramírez

Dr. Abraham Rubluo Islas

Dr. Hector González- Cerezo

Gracias al apoyo y a la ayuda brindada para la realización de esta tesis a:

Dr. Carlos Guerrero del Instituto de Química UNAM

Dra. Clara Espitia y Biol. Mercedes Vaca del laboratorio de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

Biol. Ingrid Brunner del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales en el Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM

M. en Biotec. Rebeca Ramírez del laboratorio de biotecnología de alimentos de la fac. de Química UNAM

Biol. Carmen Gutiérrez y M.en C. Teresa Ramírez del laboratorio de pruebas de actividad biológica del Instituto de Química UNAM

Este trabajo fue realizado en los siguientes laboratorios de la Universidad Nacional Autónoma de México:

Pruebas biológicas del Instituto de Química.

Cultivo de tejidos vegetales en el Jardín Botánico del Instituto de Biología.

Inmunología del instituto de investigaciones Biomédicas.

***Agradezco al CONAC y T por el apoyo económico brindado para la
realización mis estudios de posgrado
Al Instituto de Química por el apoyo económico brindado para la realización
de esta tesis.***

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	13
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	18
METODOLOGIA	20
Material químico	20
Material biológico (cultivo de tejidos vegetales)	22
Extracción de la histerina del medio de cultivo	22
Actividad enzimática (ensayo en peroxidasas)	22
Electroforesis	24
Ensayo de actividad biológica sobre <i>Artemia salina</i>	24
RESULTADOS Y DISCUSION	26
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	46

INTRODUCCION

El metabolismo en plantas se ha dividido en primario y secundario, el primero se caracteriza por que sus productos tienen una distribución amplia y están íntimamente involucrados en procesos esenciales de la vida; en cambio, los productos del metabolismo secundario tienen una distribución restringida en plantas y microorganismos, y a menudo son características individuales de géneros, especies o cepas, son biosintetizados a partir de metabolitos primarios, por ejemplo, de α -aminoácidos, acetilcoenzima A, ácido mevalónico e intermediarios de la vía del ácido shikímico. Se dice que los metabolitos secundarios no son esenciales para la vida aunque son importantes para los organismos que los producen (Herbert, 1989). Tenemos poco conocimiento del porqué, dónde y para qué, se produce una gran diversidad de sustancias químicas dentro del metabolismo secundario en vegetales, no obstante, lo que podemos mencionar hasta ahora es que éstas varían en cantidad y distribución debido a parámetros externos, órganos y estado de desarrollo de la planta, además de que algunos actúan como reguladores del crecimiento. Sin embargo, el hombre ha encontrado en estos productos naturales utilidad en diversas formas.

Las poblaciones que habitaban en nuestro país en épocas prehispánicas conocían las propiedades artesanales, medicinales y estimulantes de muchas plantas silvestres, el uso de éstas se basaba en conocimientos empíricos y se

desconocían sus principios activos de lo que ahora se denominan "productos naturales".

El uso de metabolitos secundarios aislados de plantas, sus análogos y semisíntesis tuvo un avance importante en el siglo XIX durante el periodo de crecimiento y diversidad de la industria fitoquímica que lentamente ha venido desarrollándose. El conocimiento de la actividad biológica de éstos productos ha dado como resultado el incremento en el número de fármacos usados en la medicina moderna.

Dentro de los metabolitos secundarios podemos encontrar compuestos tales como : alcaloides, esteroides, aceites esenciales, ácidos grasos, diterpenos, triterpenos, compuestos acetilénicos, flavonas, flavonoides y entre otros, a las lactonas sesquiterpénicas.

Los sesquiterpenos son productos naturales, de 15 átomos de carbono formados por la unión de tres unidades de isopreno, el sesquiterpeno más sencillo y al que se considera precursor de los demás, es el farnesol (fig 1). El primer tipo de lactona sesquiterpénica se forma a partir de la ciclización del farnesol (fig 2). (Romo de Vivar, 1985) la biosíntesis involucra enzimas como la pirofosfato farnesil sintetasa que es la responsable de la condensación a geranyl pirofosfato (Herbert, 1989) entre otros. Este tipo de productos se han aislado principalmente de extractos de flores o partes aéreas de plantas de varias familias de angiospermas y umbelíferas, así como de algunos hongos (Fischer *et al.*, 1979) , pero la mayoría de los compuestos han sido aislados de varios géneros de la familia *Compositae*. El

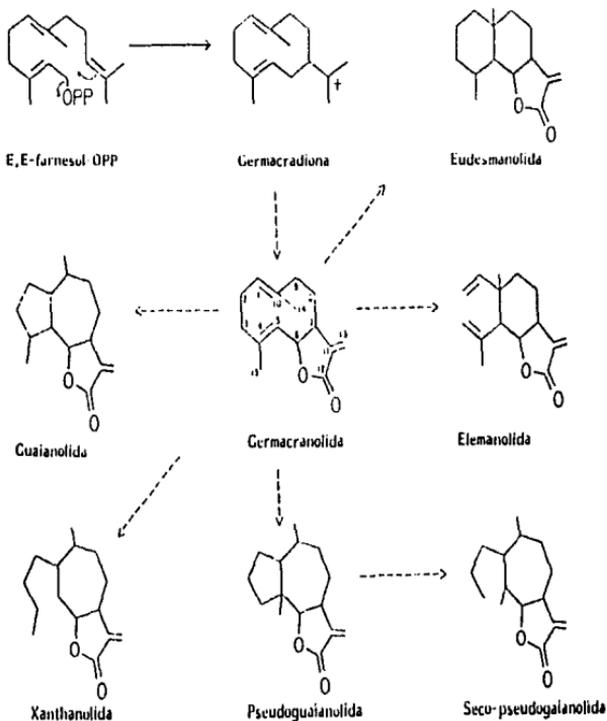
interés de este tipo de compuestos radica no solo en su valor quimiotaxonómico sino también en sus propiedades biológicas y químicas.

Figura 1. Estructura química del farnesol, precursor de los sesquiterpenos.



Durante las tres últimas décadas se ha incrementado el número de publicaciones concernientes a aspectos químicos y biológicos de lactonas sesquiterpénicas, ya que muchas de estas presentan actividad antibacterial, (Gulaçti, et.al., 1993) generalmente en bacterias Gram positiva tales como : *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Lee et.al., 1977; Picman y Towers, 1983; Gutierrez, 1994), actividad antimicótica contra *Condida albicans* y otros hongos filamentosos (Lee et.al., 1977; Picman, 1984; Blakeman y Atkinson, 1979; Gutierrez, 1994; Inoue, 1995). Ha sido demostrada la actividad antiparasitaria contra varias especies de

Fig 2 Transformación biogénica del trans-farnesol-pirufosfato a Germacradióna que por procesos de biooxidación-lactonización forma a las Germacranólidas, las cuales pueden ser consideradas el precursor biogénico de los otros tipos esqueléticos de lactonas sesquiterpénicas.



Plasmodium sp (Klayman, 1984) obteniéndose una droga antimalaria. También atacan trematodos del género *Schistosoma* (Vichnewki, et.al.,1976).

Algunas poseen actividad antihelmíntica y ha sido estudiada su actividad moluscicida sobre caracoles hospederos intermediarios de parásitos de importancia médica, con resultados alentadores (Cruz- Reyes et.al. 1989; Alarcón, 1990). También se investigaron y publicaron actividades farmacológicas, como expectorantes y estimulantes de secreción intestinal (Kowalewski, 1976; Giordano, et.al., 1990), antiúlcerosos (Giordano, et.al. 1990; Guardia y Guzman, 1994), sedantes (Wagner, 1983), analgésicos (Lucas et.al., 1964) y anti-inflamatorias (Hall et.al.1980, Abad, et.al. 1994) entre otras.

Muchas lactonas sesquiterpénicas también presentan efectos tóxicos en un amplio rango de organismos, lo que sugiere que juegan un papel ecológico importante debido a su interacción con otros seres vivos, incluyendo mamíferos, insectos, parásitos y plantas. Por ejemplo, las propiedades antialimentarias que presentan algunas lactonas contra insectos herbívoros, que reducen la sobrevivencia de larvas y adultos (Guerrero, 1990). Propiedades alelopáticas y efecto sobre los reguladores de germinación y crecimiento en plantas también son atribuidos a este tipo de compuestos.

Pero sin duda el interés primordial en éste trabajo es el hecho de que las lactonas sesquiterpénicas representan uno de los grupos de productos naturales mas grandes en los que se ha demostrado actividad citotóxica y antitumoral (Kupchan, 1970; Pettit, 1977; Cassady y Suffnes, 1980; Tellez-Martínez, 1980; Misra

y Pandey, 1981, y Picman, 1986; Woerdenbag, et.al., 1993, Woerdenbag et.al., 1994; Essam, et.al., 1996).

El grupo α - metileno- γ - lactona esta presente en muchos de los compuestos que presentan esta actividad; otras lactonas también contienen α , β - carbonilos insaturados con algunos grupos funcionales como epóxidos, éster no saturado, lactonas no saturadas y cetonas sin saturar. Estos grupos funcionales representan receptores reactivos en sitios para nucleófilos biológicos, en particular tioles y grupos amino. Por lo tanto las lactonas sesquiterpénicas pueden causar alquilaciones irreversibles de tioles esenciales y funciones amino de ciertas enzimas (Kupchan, et.al., 1971, Rodriguez, et.al., 1976; Picman, 1986; Kery, 1993).

Concerniente a los estudios sobre actividad - estructura se ha demostrado que las enzimas que contienen tioles tales como la fosfofructocinasa, la glicogeno sintetasa, DNA polimerasa y timidilsintetasa son inhibidas por lactonas. Además algunas lactonas suprimen la actividad de las enzimas glucolíticas así como a las involucradas en la síntesis de proteínas (Picman, 1986).

La histerina es una lactona sesquiterpénica extraída de *Partenium bipinnatifidum* perteneciente a la familia *Compositae* y se ha demostrado su actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de mamífero (Taboada, et.al., 1986).

Por otro lado, los callos son tejidos desdiferenciados obtenidos por medio del aislamiento y cultivo *in vitro* de órganos o tejidos organizados llevados a una desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada que da origen a una masa amorfa de

tejido. Pueden observarse diferentes tipos los cuales varían de apariencia externa, textura y composición celular (Hurtado, 1987). Algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células intimamente unidas, mientras que otros forman tejidos esponjosos con gran cantidad de espacios intercelulares. La coloración varía influenciada por factores nutricionales y ambientales. La heterogeneidad en su composición celular depende del origen del tejido, edad de los cultivos y la composición de los medios.

Las respuestas cuantitativas y cualitativas del crecimiento del callo del cultivo, involucran un sinergismo estrecho y completo entre el origen del tejido usado para la inducción, la composición del medio y las condiciones físicas que prevalecen durante esta etapa. Petalino y Collins (1985) midieron los efectos del manganeso sobre callos de tabaco; el cultivo en forma de callo de *Asparagus sp* vino a ser un conveniente sistema para probar la respuesta del tejido expuesto a amoníaco exógeno y endógeno (Seely *et al.*, 1995) y el cultivo de callos de *Citrus limon L.* fue seleccionado por Piqueras y cols. (1996) para probar la resistencia al estrés salino y el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes involucradas en el metabolismo del oxígeno.

En lo que concierne a las peroxidasa y catalasa (EC 1.11.1.7), hemoproteínas que utilizan peróxido de hidrógeno o peróxidos sustituidos para la oxidación de un gran número de sustratos, se han encontrado ampliamente en plantas superiores y se consideran un componente normal en sus células.

La gran distribución de las peroxidasa sugiere que podrían ser biológicamente importantes, sin embargo el papel que juegan en el metabolismo no es claro debido al gran número de reacciones, su catálisis y el considerable número de isoenzimas (Padiglia, et.al., 1995). Sin embargo el sistema peroxidasa puede servir como un modelo para estudiar la regulación de la expresión génica en el desarrollo de plantas. De hecho es generalmente aceptado que la actividad de peroxidasa y/o sus patrones de isoenzimas varían en la planta durante el desarrollo (Cortelazzo et.al. 1996), ya que la investigación a nivel molecular en el estudio de esta etapa sugiere que la expresión está estrechamente correlacionada con los estados del desarrollo. En sí, la diferenciación en los tejidos y órganos involucra cambios fisiológicos y bioquímicos irreversibles, los cuales son transmitidos en líneas celulares. La caracterización de cultivos celulares y el estudio de caracteres transmitibles debe ser dirigido hacia propiedades bioquímicas y fisiológicas más que a características morfológicas; diversas isoenzimas son potencialmente usadas como índices bioquímicos para estos estudios. La expresión que da una enzima puede cambiar con el tiempo y el tejido específico, este cambio puede involucrar diferentes genes estructurales, regulatorios y/o factores difusibles (Del Grosso, et.al., 1987, Swarnkar, et.al. 1986).

Diversos autores han propuesto que las peroxidasa catalizan interacciones con ácidos fenólicos entre macromoléculas tales como lignina, proteínas, hemicelulosa y ácido ferúlico. Se ha observado que la peroxidasa de *Opuntia ficus indica* cataliza la oxidación de muchos fenoles y aminas aromáticas en presencia de

peróxido de hidrógeno (Padiglia, et al., 1995) estas enzimas pueden restringir el crecimiento celular por rigidificación de la pared celular y se ha visto que los grupos con extremo feruloil dan cierta solubilidad a los polisacáridos con la propiedad de producir geles por sobreoxidación con peróxido de hidrógeno mas peroxidasa; se ha especulado que esta gelificación oxidativa de los polisacáridos de la matriz en la pared celular pueda afectar su extensibilidad y así su velocidad de crecimiento (Cassab y Varner, 1988). Rodriguez y Van Huystee (1994) mencionan que la expansión de la pared celular todavía está en discusión y proponen que una de las causas para impedir el crecimiento por las peroxidasa es debido a la polimerización de tirosina a extensina catalizada por las peroxidasa.

También las isoperoxidasas han sido usadas como un marcador primario de la diferenciación *in vitro*, en células de mesófilo de *Zinnia* en elementos traqueidales estas isoenzimas son inducidas en la pared celular en tracciones, 36 h después de la inducción de células mesófilas a elementos traqueidales (Church y Galston, 1987) los inhibidores que bloquean o retrasan la diferenciación de traquidas reducen la expresión de las isoenzimas de peroxidasa, lo que sugiere que la modulación de los niveles de la diferenciación específica de isoperoxidasas está relacionada a la formación de traqueidas; no se sabe como es que estas enzimas estan involucradas pero parece ser que la maquinaria de la pared celular regula la diferenciación (Cassab y Varner 1988)

Estudios sobre diferenciación celular han mostrado una relación paralela entre el incremento de la actividad de peroxidasa y el contenido de lignina de

traqueidas formadas, ya que durante la diferenciación de traqueidas, la lignina se forma por la polimerización de alcoholes hidroxycinnamil sobre las paredes secundarias, esta polimerización se piensa es catalizada por peroxidasas (Sato, et.al. 1995).

La función de las peroxidasas extracelulares concierne a la síntesis de lignina de la pared celular (Rodriguez y van Huystee, 1994), además, estudios detallados han mostrado que las peroxidasas específicamente polimerizan radicales feruloil en la formación de interacciones en la pared celular de plantas (van Huystee y Cairns, 1982).

Se sabe que las peroxidasas están involucradas en la inducción de biosíntesis de nuevas células lo cual puede ser una respuesta importante ya que se ha observado un incremento en la actividad peroxidásica como respuesta al estrés (Smith, et.al., 1994), a la invasión de organismos patógenos (virus, bacterias y hongos), estrés salino y calórico, reparación de heridas y contaminación del aire, lo cual sugiere que en condiciones de estrés las células de plantas sean un excelente sistema para monitorear la producción de peroxidasas, ya que éstas son ampliamente usadas como un importante reactivo para diagnóstico clínico que permite hacer inmunoensayos microanalíticos por su alta sensibilidad en reacciones, y otras aplicaciones en el campo de la medicina, química e industria de alimentos incluyendo la eliminación de compuestos fenólicos y aromáticos; la mejor fuente comercial de peroxidasas es la raíz del rábano picante *Armoracia rusticana* (Kwak, et.al., 1995). Tenemos entonces, que las plantas poseen varias isoenzimas

de peroxidasas en donde el patron de expresión es específico del tejido, regulando el desarrollo y controlado por estímulos ambientales.

Se han caracterizado tres grupos de isoperoxidasas: el primero las isoenzimas catiónicas, que se localizan en la vacuola central y cataliza la síntesis de, peróxido de hidrógeno, NADH y agua. Estas isoenzimas tienen también actividad sobre la indolacético ácido-oxidasa en ausencia de peróxido de hidrógeno y pueden proveer de este a otras isoenzimas de peroxidasas en células de tabaco (Cassab y Varner 1988), ya que se encuentran involucradas en la degradación del ácido indolacético, pudieran jugar un importante papel en la regulación del crecimiento de la planta (Ingermarson, 1995) las peroxidasas catiónicas de cacahuete son catalizadores en la polimerización de ácido ferúlico el cual causa la gelatinación de la solución pentosan y así rigidifica la pared celular (Rodriguez y van Huystee, 1994). El resto de sus otras funciones no está aclarado todavía.

El segundo grupo son las isoperoxidasas moderadamente aniónicas. Estas están localizadas en la pared celular y poseen actividad moderada sobre los precursores de lignina. Se han encontrado altamente concentradas en heridas en tallos de planta de tabaco (Lagrimini y Rothstein, 1987).

En el tercer grupo se encuentran las peroxidasas aniónicas las cuales pueden tener una acción específica como catalizador en las reacciones citoplásmicas tales como la oxidación del ácido ascórbico, y el ácido indolacético (Rodriguez y van Huystee 1994, Gazaryan y Lagriminni, 1996). Están asociadas a la pared celular, formando interacciones entre diferentes constituyentes, tales como lignina y

glicoproteínas (Ingermarson, 1995) tienen una alta actividad en la polimerización de alcoholes cinamil *in vitro* (Rodríguez y van Huystee, 1994). Se han detectado acumuladas en heridas cicatrizadas en tubérculos de papa; estudios inmunoquímicos con un anticuerpo específico a una isoperoxidasa aniónica asociada con suberización, mostró que en el tejido del tubérculo de papa, esta enzima se encontraba sólo del lado interno de las paredes celulares (Espelie, *et al.*, 1986) así que la deposición de un dominio polimérico aromático de suberina involucra una isoperoxidasa aniónica. Se ha visto que la formación del peridermo suberizado es una respuesta usual a heridas en cualquier órgano de la planta. La suberina forma una barrera y consecuentemente un sello en una herida para evitar la pérdida de agua.

En trabajos iniciales en el estudio de tejidos vegetales se observaron notables cambios de color sobre la superficie de los callos. Pruebas bioquímicas preliminares mostraron que esos cambios estaban asociados a peroxidadas. Por tanto se decidió iniciar un programa de investigación para evaluar el efecto de la histerina sobre el crecimiento y niveles de peroxidadas en callos inducidos de *Phaseolus vulgaris* L.

Adicionalmente se analizaron y compararon los resultados obtenidos en citotoxicidad de la histerina sobre células vegetales normales en este caso callos de *P. vulgaris*, con otros modelos usados para determinar actividad citotóxica ya que si un compuesto presenta actividad citotóxica implica la posibilidad de que éste tenga acción antitumora

ANTECEDENTES

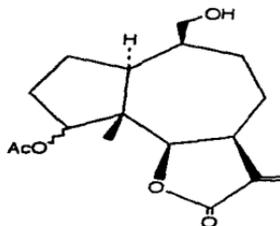
México es un país que cuenta con una gran diversidad de plantas superiores (Toledo, 1988) y una de las familias mejor representadas es la *Compositae*, por esto, es y ha sido estudiada exhaustivamente, ésta familia consta de más de 1000 géneros y 20 000 especies, se encuentra dividida en 14 tribus:

- | | |
|----------------|-----------------|
| 1. Vernoneae | 8. Senecioneae |
| 2. Astereae | 9. Tageteae |
| 3. Eupatoreae | 10. Artoteae |
| 4. Inuleae | 11. Calenduleae |
| 5. Heliantheae | 12. Cynareae |
| 6. Helinieae | 13. Muticeae |
| 7. Anthemideae | 14. Lactuceae |

El género *Parthenium*, pertenece a la tribu Heliantheae; *Parthenium bipinnatifidum* es una planta herbácea, anual, erecta o ascendente, hasta 50 cm de alto; tallo comúnmente ramificado, estriado, hispido; hojas de 2 a 25 cm de largo. Ampliamente distribuida y frecuente en las partes bajas del Valle de México, en el altiplano a una altitud de 2250 a 2650 msnm. La zona de distribución incluye Chihuahua, de Nuevo León a Veracruz, Puebla y Guerrero (Rzedowsky, 1985).

Casi todas las especies del genero *Parthenium* contienen lactonas sesquiterpénicas con esqueleto pseudoguayano. Uno de los grupos funcionales mas frecuentes en pseudoguayanoidas es la cetona de C-4, sin embargo en varias lactonas aisladas de este género esta cetona no existe y en su lugar se encuentra un grupo alcohol o un agrupamiento acetoxilo, esto se observa en la histerina (fig 3. Fischer et.al. 1979). Este compuesto fue aislado de *P.bipinnatifidum* (Romo de Vivar, et.al. 1966) en época de floración. El nombre de histerina proviene de que erróneamente la planta fue clasificada primero como *P. hysterophorus*.

Figura 3. Estructura química de la histerina.



Se han estudiado los patrones enzimáticos de peroxidasa en varias especies vegetales (Swarnkar 1986; Del Grosso, et.al. 1987; Ingermarson, 1995; Sato, et. al.

1995), cuyos pesos moleculares (PM) fluctúan ,por ejemplo, entre: $58,000 \pm 2,000$ Daltons (Da) en *Opuntia ficus indica* (Padiglia, et.al., 1995), en cacahuete se han caracterizado una peroxidasa catiónica de 44,000 y una aniónica de 46,000 (van Huystee y Cairns, 1982), otra de 40, 000 en camote (Kawak, et.al., 1995), en semillas de *Ipomea batatas* se purificó una peroxidasa de $41,000 \pm 1,000$ (Floris, et.al., 1984), del latex de *Euphorbia characias* existe otra de 48,000 (Floris, et.al., 1984), encontramos reportadas hasta 7 peroxidosas en nabo con PM entre 33,890 y 31,060 (van Huystee y Cairns, 1982) y por supuesto la peroxidasa del rábano picante que tiene un PM de 40,000(Geoffrey, et.al. 1995) entre muchas otras.

Trabajos en *Phaseolus vulgaris* sugieren que la actividad de peroxidosas y de patrones de isoenzimas en callos, parecen correlacionar a factores del desarrollo y al genotipo; ya que las células que derivan de cultivos mas jovenes muestran mas actividad que las mas viejas, se postula que el efecto de inducción sobre peroxidosas en cultivos celulares son máximos en los primeros días después de la germinación, porque la activación génica es incompleta, habiendo así un mayor potencial para responder a señales del desarrollo y/o ambientales (Del Grosso, et. al. 1987). Estudios en hipocotiledones de *P. vulgaris*, han demostrado con técnica de inmunolocalización, que las peroxidosas están presentes durante los estados tardíos de la diferenciación del xilema, éstas enzimas tienen un P.M. de aproximadamente 46,000 Da. (Smith, et.al., 1994).

También los callos de *Phaseolus sp* se han usado como un sistema para probar el efecto de auxinas (Mok and Mok, 1977) y puede constituir un buen

método, reproducible con facilidad, para probar la acción de muchas otras sustancias.

Por otro lado, en la década de los 50s. el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos comenzó una intensa investigación con los productos naturales extraídos de plantas superiores, esto provocó que en el resto del mundo se incrementara el interés en la búsqueda de estos productos con actividades biológicas, entre ellas citotóxicas y antitumoral.

Se han reportado cientos de constituyentes de plantas (con diversas estructuras químicas) que destruyen células *in vitro* por diversos mecanismos, sin embargo, no todos éstos compuestos citotóxicos poseen una actividad antitumoral cuando son probados en modelos *in vivo*, esto indica que la citotoxicidad es necesaria pero no suficiente para una actividad anticancerígena, pero, todos los agentes antitumorales presentan una consistente actividad citotóxica, por eso la importancia en el estudio de éstos compuestos. Los resultados con respecto a citotoxicidad son expresados en CL_{50} (concentración letal al 50%), para el Instituto Nacional del Cáncer (Estados Unidos), se consideran importantemente activas las concentraciones de $CL_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$ para extractos. y $< 4 \mu\text{g/ml}$ para sustancias puras, en líneas celulares (Colegate, 1993).

Debido al gran número de especies vegetales que existen en naciones del tercer mundo, se han propuesto una serie de bioensayos simples, poco costosos y sin utilizar equipo sofisticado, para la búsqueda de productos bioactivos extraídos de plantas. Uno de éstos bioensayos ya utilizado en muchos laboratorios de

investigaciones es el efecto que un producto natural produce sobre *Artemia salina*, que detecta un amplio rango de actividades biológicas incluyendo citotoxicidad (Meyer, 1982; McLaughlin, 1991).

Taboada et al. (1986) reportan la actividad citotóxica de la histerina en diferentes líneas celulares, una normal, (fibroblastos de tejido conectivo murino L929) y otra de origen canceroso, (carcinoma laríngeo humano HEp2c), la concentración letal cincuenta se obtuvo mediante la determinación del número celular, en controles y tratadas, se midió el índice mitótico y el porcentaje de células multinucleadas, mostrando que la CL₅₀ de la histerina para la línea L929 fue 1µg/ml y en Hep2c entre 5µg/ml y 10µg/ml (Taboada, et al. 1986).

En base a lo anterior se planteó la hipótesis general y los objetivos de este trabajo.

HIPOTESIS

Si la histerina inhibe la división celular de callos inducidos en *P. vulgaris* entonces esta lactona está modificando, entre otros mecanismos, la actividad y el patrón isoenzimático de peroxidasas

OBJETIVOS

1. Evaluar la actividad citotóxica de la histerina sobre callos inducidos de *Phaseolus vulgaris* L. (expresada en gramos de crecimiento del callo, al agregar histerina en el orden de $\mu\text{g/ml}$ en el medio de cultivo)
2. Determinar la persistencia de histerina en el medio de cultivo de los callos inducidos
3. Evaluar el efecto de la histerina sobre el patrón isoenzimático y actividad de peroxidasas en células tratadas y sin tratar

Colateralmente comparamos diferentes modelos de citotoxicidad y el efecto de la histerina sobre callos de *P. vulgaris* con los siguientes objetivos

- 1.. Correlacionar los resultados en células vegetales con los reportados en líneas celulares de mamífero (L929) y (Hep2c)**
- 2. Determinar la CL₅₀ de la histerina en *Artemia salina* y correlacionar los resultados en células animales y vegetales**

METODOLOGIA

Material Químico

La histerina fue generosamente donada por el Dr. Carlos Guerrero del Instituto de Química de la UNAM quien identificó, aisló y purificó de *Parthenium bipinnatifidum* colectado en la ciudad de México.

Material biológico (cultivo de tejidos vegetales)

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. utilizadas, fueron de la variedad flor de mayo, donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, México D.F., con el objetivo de tener menor variabilidad genética. Las semillas se lavaron con agua y jabón y desinfectaron con alcohol al 70% durante 10s y clorex al 20% durante 15 minutos agitando constantemente, sembrándose en los germinadores (frascos con algodón y agua, estériles), después de 8 días bajo oscuridad se obtuvieron las primeras hojas cotiledonarias utilizadas para los explantes.

El medio para el cultivo de tejidos vegetales usado en esta caso fue el descrito por Murashige - Skoog (MS)(1962) enriquecido con 2,4-D (2mg/l), la histerina se agregó por filtración a los medios (con un filtro millipore Swinnex X-25 con membrana de diámetro 0.22 μ) en diferentes concentraciones y en condiciones estériles.

Las primeras hojas cotiledonarias se cortaron en tres secciones del mismo tamaño (entre 0.8 x 0.5mm), éstos explantes fueron transferidos a los medios de cultivo en donde comenzó a desarrollarse el tejido.

La siembra de tejidos para producción de callo se realizó en dos experimentos, en el primero se utilizaron 12 frascos con 30 ml de medio MS adicionándole 2-4-D (2mg/l) y cuatro explantes en cada uno, 3 frascos con histerina agregada al medio (esterilizada por filtración) en cada uno con las siguientes concentraciones: 25, 50, 100 y 200µg/ml, y el control durante 12 semanas. Del efecto causado por la histerina en el crecimiento de los callos en éstos resultados, elegimos las concentraciones para el segundo experimento, las cuales fueron 75, 100, 125, 150, 175, 200 y 225µg/ml a tubos con 10ml de medio y un explante cada uno; 20 repeticiones de cada concentraciones y el control.

Los explantes fueron incubados por un fotoperiodo de 16 h luz (3.2 w^m-2) y 8 h oscuridad; haciéndose observaciones generales con respecto a la coloración, aparición del callo y tipo de los callos semanalmente, y se midió el peso fresco a las 12 semanas. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente, t de student para los resultados de la primera fase y en la segunda un análisis de varianza (ANOVA), homogeneidad de la varianza y posteriormente la prueba de rango múltiple de Dunett (comparación del testigo con los tratamientos).

Extracción de la histerina del medio cultivo

Se reunieron todos los medios que contenían las mismas concentraciones de histerina y agregándole una solución de 100 ml de agua-metanol (1:1), se calentó hasta disolver el agar; 24 h más tarde la suspensión fue filtrada por un embudo Buchner con papel filtro (Wathman No 42) y celita.

Subsecuentemente al filtrado se le agregó 50 ml de diclorometano se decantó con un embudo de separación y finalmente fue concentrado. Los cristales obtenidos después de que el solvente fue evaporado, se corrieron en una placa de cromatografía en capa fina, para determinar si se trataba de histerina, usando como control cristales de histerina pura aislada de *P. bipinnatifidum*

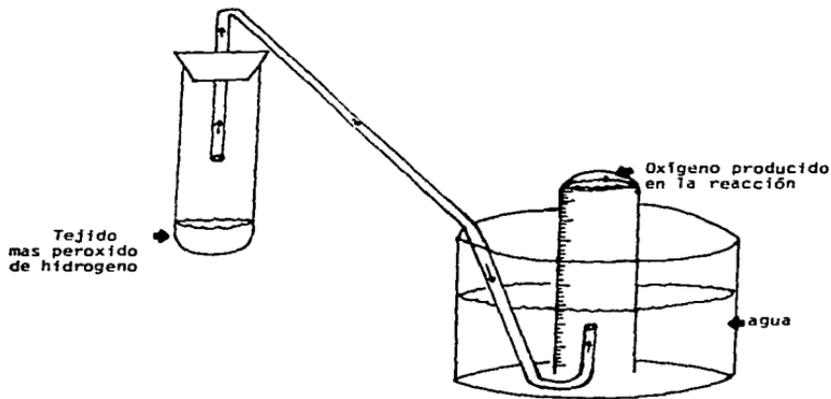
Actividad enzimática (ensayo en peroxidasas)

El parámetro para medir la actividad de las peroxidasas en este caso, fue la cantidad de oxígeno liberado, al poner en contacto el tejido vegetal con peróxido de hidrógeno.

Para este ensayo se utilizaron tejidos de *Phaseolus vulgaris* de hoja, callo control y callo crecido en un medio con 150 µg/ml de histerina. Los tejidos por separado fueron homogenizados con un buffer de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7 (4:1 P/V) y 3ml de cada muestra se colocaron en la cámara propia un aparato experimental utilizado para este propósito (figura 4), agregándole 0.3 ml de peróxido de hidrógeno. Midiéndose el oxígeno liberado por el decremento en el nivel del agua del tubo graduado durante 4 h, en lapsos de minuto a minuto hasta

30, y posteriormente realizando medidas cada 5 min durante otros 30 y un último periodo cada 15 min hasta las 4 horas.

Fig 4. Diseño de experimento, utilizado para determinar la cantidad de oxígeno (ml) liberado en la reacción provocada al poner en contacto el tejido con peróxido de hidrógeno.



Electroforesis

Se utilizaron tejidos de hoja (crecida en obscuridad) y callos sin histerina así como crecidos en medios con 75, 100 y 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de histerina. Se homogenizaron con un buffer de fosfato 0.1 M a pH 7 en una proporción de 10:1 (tejido-buffer) para el callo y 1:1 para hoja.

Los homogenados se centrifugaron a 14 000 rpm, durante 15 min, 15 μl de cada sobrenadante fue usado para electroforesis PAGE.

El SDS-PAGE fue hecho de acuerdo al método de (Laemmly, 1972) con 12% de poliacrilamida, en una cámara para electroforesis EC-105, Mighty Small II vertical. Los geles fueron teñidos con azul de coomassie R-250, desteñidos y fotografiados. Se diseñó una imagen digitalizada de la fotografía tomada del gel.

Se utilizaron como marcadores de PM a fosforilasa B (112,000), albúmina sérica de bovino (84,000), ovoalbúmina (53,200), anhidrasa carbónica (34,900) inhibidor de la tripsina de soya (28,700) y lizosima (20,500 Dalatons).

Ensayo de actividad biológica sobre *Artemia salina*

Este bioensayo es muy usado en la investigación de productos naturales, el procedimiento determina la CL_{50} en valores de $\mu\text{g}/\text{ml}$, la toxicidad se manifiesta en la letalidad de la larva (Mayer, et.al. 1982) y los resultados se basan en la comparación con los obtenidos en varias líneas celulares de mamífero. Los

huevoecillos de este crustáceo son viables, de bajo costo, y eclacionan en poco tiempo (48h).

Se preparó medio para el cultivo de la larva con solución salina al 3.5 ‰ y en un pequeño estanque plástico de 16cm de largo, 10cm de ancho y 5cm de altura (dividido en parte oscura y parte iluminada) se agregaron los huevoecillos que se mantuvieron en la oscuridad, a temperatura de 24-25 °C y se incubaron durante 48h. Al término de este periodo se colocó una lámpara de luz blanca y las larvas con fototropismo positivo pasaron de la parte oscura a la parte iluminada del estanque.

En viales de 10 ml que contenían 7 ml de cada concentración de histerina (25,50 y 100 µg/ml) en solución salina y testigos (solo con solución salina), se colocaron 10 larvas en cada uno, y utilizando 9 viales por muestra, se cuantificó la mortalidad a las 24h. Los resultados se sujetaron a un análisis probit de acuerdo al programa propuesto por de Finney Purde para determinar CL_{50} con intervalo de confianza del 95% (Meyer, 1982; McLaughlin, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSION

El crecimiento de los callos en el primer experimento (con concentraciones de 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de histerina agregada a los medios de cultivo) tuvo un comportamiento sigmoideal, observandose un retardo en el inicio de la formacion del tejido en los tratamientos que contenfan 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de histerina en los medios nutritivos.

A estos resultados (Tabla 1), se les aplicó un t de student para analizarlos estadísticamente que mostrando diferencia significativa a $p < 0.05$ (respecto al control) en las concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 1. Peso fresco (g) \pm E.E. en callo de *P. vulgaris* con diferentes concentraciones de histerina ($\mu\text{g/ml}$) en el medio de cultivo MS + 2-4-D (2mg/l) lectura a las 12 semanas.

	CONTROL	25	50	100	200
Media \pm E.E.	1.246 \pm 0.230	1.191 \pm 0.114	1.196 \pm 0.180	0.037 \pm 0.009	0.077 \pm 0.025
		ns	ns	s	s

ns = diferencia no significativa en la prueba estadística de t de student respecto al control
s = diferencia significativa en la prueba estadística de t de student respecto al control

Cómo se puede ver en la tabla 1, las concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ tuvieron una diferencia significativa en peso fresco con respecto a los controles, lo cual nos indica que a éstas dosis la histerina provoca un cambio en los callos y que tiene una citotoxicidad efectiva a concentraciones intermedias y/o mayores.

Dados los resultados anteriores se decidió trabajar con soluciones de histerina en los medios de cultivo con las siguientes concentraciones: 75, 100, 125, 150, 175, 200 y 225 $\mu\text{g/ml}$. El retraso en el inicio del crecimiento en los callos experimentales definió el tiempo que tardaría este segundo experimento, en donde los pesos frescos se registraron a las 12 semanas, después de sembrar los explantes.

Se observó también, que en los controles la coloración en la superficie de los callos, con el tiempo cambió de un ámbar pálido a café oscuro; en cambio, en todos los tratamientos, sobre todo en las dosis altas (100 y 200 $\mu\text{g/ml}$, que tardaron mas tiempo en iniciar su crecimiento) presentaron coloración de blanca a ámbar pálido. Pruebas bioquímicas preliminares, en el cultivo de tejidos vegetales han mostrado que esos cambios estan asociados a peroxidasa.

Con respecto a la forma del tejido, los callos control presentaron un aspecto homogéneo y compacto; mientras que en los tratados con histerina observamos el inicio de los callos especialmente en nervaduras del explante y predominó el tejido friable blanco y color ámbar pálido al comienzo de la formación del callo (en todas las concentraciones), y mostró tejido heterogeneo y café en algunas partes al término del experimento (figuras 5 y 6).

Fig 5 Callo normal de *P. vulgaris* crecido en MS+2-4-D (2mg/l) a 3 meses



Fig. 6 Callo de *P. vulgaris* con histerina (50 µg/ml) adicionada al medio



El crecimiento del callo del segundo experimento en todos los casos, tanto control como tratados, presentó tres etapas: a) inicio, b) crecimiento rápido, y c) estacionaria. Notándose una marcada diferencia en el tiempo de inicio de formación del callo, sobre todo con las concentraciones mas altas; se observó que con 175 $\mu\text{g/ml}$ el nuevo tejido apareció en el transcurso de la segunda semana, y con las de 200 y 225 $\mu\text{g/ml}$ éste apareció hasta la sexta semana. En contraste, los controles formaron callo (de diferente tamaño) desde los 8 días en un 100% de los tubos.

El porcentaje de explantes con tejido formado a la sexta y décimo segunda semanas se presenta en la tabla 2. Se eligió la semana 6 porque fue el tiempo que se observó callo en todas las concentraciones y a las 12 semanas como final del experimento debido a que en ese tiempo ya no se notaron cambios sustanciales en los callos (control y experimental).

La histerina provocó un retardo en la presencia de callo (reflejándose en el porcentaje de explantes con tejido formado)(tabla 2), este efecto se observó a partir de las concentraciones de 125 $\mu\text{g/ml}$ y se acentuó conforme aumentó la concentración de histerina. Los medios con 200 y 225 $\mu\text{g/ml}$ tardaron 6 semanas en formar callo (cómo se explicó anteriormente) A las 12 semanas presentaron callo el 100% de los tubos en las concentraciones de 75 hasta la de 125 $\mu\text{g/ml}$ y al aumentar las concentraciones este porcentaje disminuyó hasta la de 225 $\mu\text{g/ml}$, en donde no hubo cambio desde la sexta semana.

Tabla 2. Porcentaje de explantes con callo formado a la sexta y decimo segunda semana, control y diferentes concentraciones de histerina en los medios de cultivo.

Histerina µg/ml	% de explantes con callo semana 6	% de explantes formando callo semana 12
CONTROL	100	100
75	93.75	100
100	100	100
125	68.42	100
150	81.25	93.34
175	72.2	72.2
200	55	65
225	20	20

El peso fresco de los callos se midió a las doce semanas (tabla 3). El análisis de varianza (tabla 4) de estos resultados, nos indica que la histerina en concentraciones desde 75 µg/ml, inhibe significativamente el crecimiento en callos de *P. vulgaris* L. Podemos observar en figura 7, que la tendencia de la histerina es llegar a una inhibición total del crecimiento a concentraciones mayores cercanas a 225µg/ml. Si comparamos la tabla 2 y 3, podemos observar que a pesar de que hubo callo formado en todas las repeticiones en las concentraciones de 75, 100, 125 y 150 µg/ml el tejido era pequeño. Cabe hacer notar que a partir del tratamiento de 75µg/ml tanto el porcentaje de presencia como el tamaño del callo fueron mucho menores.

Tabla 3. Peso fresco (g) \pm EE de callos de *P. vulgaris* con diferentes concentraciones de histerina ($\mu\text{g/ml}$) en el medio de cultivo a doce semanas.

Histerina	n	media (g) \pm EE
0 (control)	18	1.6646 \pm 0.1215
75	16	0.5059 \pm 0.1325
100	15	0.4006 \pm 0.0958
125	19	0.4753 \pm 0.1772
150	16	0.3010 \pm 0.1341
175	17	0.3802 \pm 0.1312
200	20	0.3613 \pm 0.1169
225	20	0.0786 \pm 0.1520

Tabla 4. Análisis de varianza para $p < 0.05$, de los pesos frescos de callos de *P. vulgaris* con diferentes concentraciones de histerina en los medios de cultivo a doce semanas en cultivo

Fuente de variación	Cuadrado medio	Grados de libertad	Cuadrado	F calculada	F de tablas
Efectos principales	35.074	26	1.349		
V1	5.740	19	0.302	1.137 N.S.	1.68-2.06
V2	29.861	7	4.266	16.058**	2.10-2.82
Efecto lineal	16.4793	1	16.4793		
Residual	30.285	114	0.266		
Total	65.360	140	0.467		

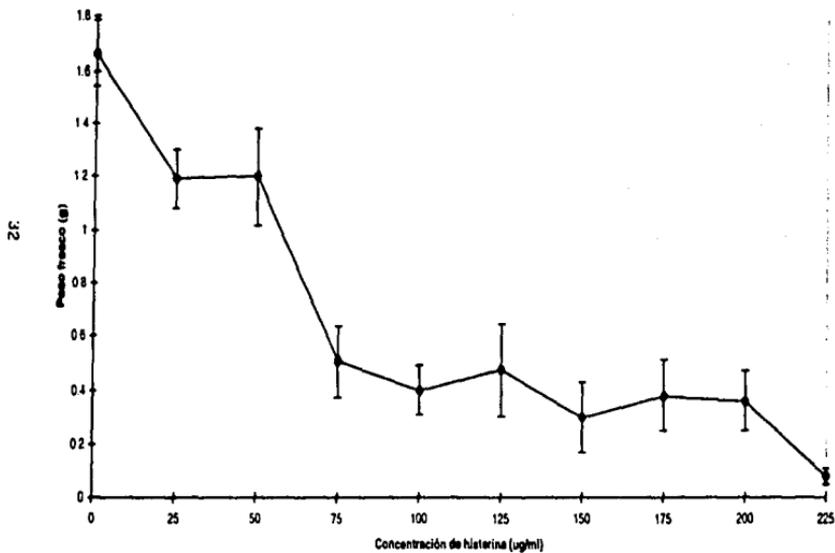
V1 = diferencias entre repeticiones

V2 = diferencias entre tratamiento

N.S. = No significativo

** = Altamente significativo

Fig. 7 Efecto de la histerina sobre el crecimiento de callos de *P. vulgaris* (12 semanas de cultivo)



Dados los resultados analizados en diferencias de peso fresco se compararon los resultados del control con todos los grupos experimentales, de acuerdo a la prueba de rango múltiple de Dunnett (tabla 5). Se encontró que todos los tratamientos son diferentes significativamente respecto al control, ya que las diferencias observadas en todos los casos son mucho mayores a 0.3056 (diferencia mínima significativa calculada) en un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

Tabla 5. Análisis de Dunnett.

Tratamientos que se comparan	Promedio control	Promedio que se compara	Diferencias observadas
Control vs 75	1.6646	0.5059	1.1587
Control vs 100	1.6646	0.4006	1.2640
Control vs 125	1.6646	0.4763	1.1886
Control vs 150	1.6646	0.3010	1.3636
Control vs 175	1.6646	0.3802	1.2844
Control vs 200	1.6646	0.3613	1.3033
Control vs 225	1.6646	0.0786	1.5860

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$, diferencia mínima calculada 0.3056

Con respecto a la coloración y forma del tejido se presentaron las mismas características que en el primer ensayo, callo friable-esponjoso (coloración blanca a amar pálido) característico de tejido nuevo en los experimentales aun hasta las 12 semanas haciendose notar que iniciaba en las nervaduras del explante (fig 8 y 9).

En los controles el tejido era homogéneo y con el tiempo se fue tornando café oscuro, sin observar que crecieran preferentemente en algún sitio especial del explante.

Dada la importancia de todos los resultados, nuestro interés se enfocó a determinar si persistía histerina en los mismos medios de cultivo con las diferentes concentraciones en que crecieron los callos experimentales y así sugerir la existencia de alguna relación.

Extracción de la histerina de los medios de crecimiento de los callos

Los resultados en este caso fueron solo cualitativos, se obtuvieron cristales de histerina de los tratamientos de 175, 200 y 225 $\mu\text{g/ml}$ en el medio donde había explantes que no formaron callo o éste último era pequeño, en las demás concentraciones no se encontró histerina. Cabe aclarar que la sensibilidad de la metodología utilizada pudo no haber sido suficiente para detectar pequeñas concentraciones de la lactona.

No obstante con estos resultados se sugiere que las células del tejido desdiferenciado tiene capacidad de crecer y formar los callos aun presencia de histerina pero en bajas concentraciones las cuales alcanzan a metabolizar, pero cuando esta concentración rebasa ciertos límites (75 $\mu\text{g/ml}$) la lactona actúa inhibiendo los procesos de crecimiento y expresión celular, afectando probablemente mecanismos de regulación del crecimiento sobre algunas enzima participantes en éste proceso.

Fig. 8 Callo de *P. vulgaris* con histerina (200µg/ml) adicionada al medio



Fig. 9 Callo de *P. vulgaris* con histerina (150µg/ml) adicionada al medio



Actividad de peroxidasas (EC.1.11.1.7.)

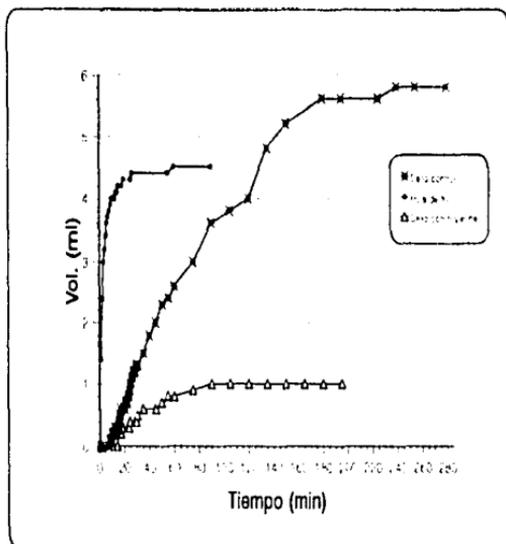
En la figura 10, se muestra un perfil de la actividad de las peroxidasas, al medir la producción de O₂ en diferentes tejidos de acuerdo a la reacción:



La actividad peroxidásica en el homogenado de hoja es muy alta desde el principio así, en el primer minuto la actividad es exponencial, disminuyendo conforme aumentaba el tiempo haciéndose progresivamente constante aproximadamente a los 20 minutos (min). Este tejido se utilizó solo como un primer parámetro de comparación para la actividad de las peroxidasas en los callos.

En el callo control la actividad sigue un curso constante (menor velocidad que en la hoja) hasta los 200 min. A lo largo del tiempo transcurrido se notan escalonamientos en el curso de la reacción, lo que sugiere la presencia y participación de isoenzimas. Con respecto a los callos que crecieron en medios con histerina, éstos presentaron actividad baja (comparativamente, fig. 10) hasta los 100 min a partir de los cuales la actividad permaneció constante. Por tanto, la histerina en los medios de cultivo afecta a la actividad de peroxidasas en callos inducidos de *P. vulgaris* lo cual parece indicar que esta lactona está afectando mecanismos importantes de crecimiento, diferenciación, organogénesis y respuestas al estrés, ya que se le atribuyen a las peroxidasas en vegetales éstas y muchas otras actividades (Cassa y Varner, 1988; van Huystee y Cairns, 1982; Del Grosso, 1987; Rodríguez y

fig.10 Actividad de peroxidasas en hoja y callos de *P. vulgaris*



Actividad de peroxidasas de homogenado de hoja de *P. vulgaris* —▲—, actividad en callos —▲— y en callos desarrollados en medio de cultivo con 150 mg/ml de histerina —▲—. La actividad decrece cuando la lactona está presente y la actividad escalonada del callo control sugiere la presencia de isoenzimas.

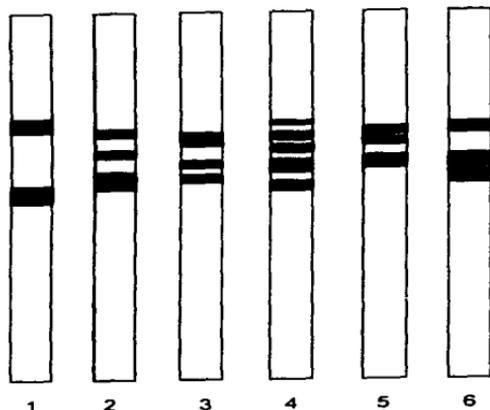
van Huystee, 1994; Smith, et.al. 1994; Kwak, 1995; Ingermarsson 1995; Sato, et.al. 1995). Esto explicaría, en parte, el retardo en el crecimiento, la diferencia en la coloración y la morfología de los callos tratados con histerina.

Perfil enzimático

El diagrama electroforético (figura 11) muestra que las hojas de *P. vulgaris* contienen una batería de enzimas (carril 2) y éstas poseen PM de 52,480; 47,863 y 38,904 Daltons. El patrón enzimático en callo(carril 3), difiere sensiblemente de la hoja, aunque se localizan tres bandas estas son de diferente peso molecular (50,118; 43,651 y 41,686).

Se ha descrito que las peroxidasas intervienen en la regulación de una serie de funciones, en consecuencia, uno de los efectos que primeramente se pudieron detectar experimentalmente es la aparición de seis bandas en la placa electroforética donde se ponen muestras de callos que crecieron en medios de cultivo con una concentración de 75 µg/ml, (con PM de 55 590, 53 088, 47 315, 43 315, 39 810 y 38 018 Da) el mismo patrón cambia a solo tres bandas de diferentes pesos moleculares en las concentraciones de histerina de 100 µg/ml (con PM de 52 480, 51 286 y 43 900 Da) y 150 µg/ml (PM de 52 480, 43 651 y 40 738 Da). Lo cual indica cambios en el metabolismo en los callos de *P. vulgaris* tratados. Parece ser que la lactona utilizada en éste trabajo, tiene un efecto regulador sobre algunas actividades que involucran a las peroxidasas.

Fig 11 Electroforesis (PAGE) de callos inducidos de *P.vulgans* con diferentes concentraciones de histerina en el medio de cultivo



Electroforesis en PAGE (12%) que muestra de izquierda a derecha: En el carril 1, los marcadores de PM (53,200 y 34,900 da); en el carril 2, 50 µl de homogenado de hoja, en el carril 3, 50 µl de homogenado de callo control; en los carriles 4, 5 y 6, 50 µl en cada uno, de homogenado de callo crecido en medio de cultivo con diferentes concentraciones de histerina: 75, 100 y 150 µg/ml respectivamente.

Diversos autores (Casab y Varner, 1988; Rodriguez y van Huystee, 1994; Ingermarson, 1995) han mostrado que las peroxididasas juegan un papel importante en la velocidad y regulación del crecimiento en células vegetales al interactuar con otros compuestos tales como el ácido indolacético.

El retardo que se observó en el inicio del desarrollo de los callos tratados con histerina (tabla 2), y los cambios que se observan en el gel de electroforesis (fig 11) muestran que ésta lactona pudiera estar inhibiendo el crecimiento celular por un mecanismo enzimático en el cual participan peroxididasas ya que cambia el patrón isoenzimático con las diferentes concentraciones de histerina.

Observamos 6 bandas diferentes en el carril 3 (perfil electroforético) que corresponde a la concentración de 75 µg/ml de histerina en el medio, ésta es la concentración en la cual el tamaño de los callos fue superior y que inició su crecimiento antes que las otras. Al parecer podría haberse disparado un mecanismo para la síntesis de diferentes isoenzimas que favorecieran el crecimiento y otras actividades en las que están involucradas las peroxididasas. Conforme aumentó la concentración de la lactona, ese mecanismo sería inhibido regresando al patrón de 3 isoenzimas (diferentes a las del control) provocando un crecimiento del callo considerablemente menor. No obstante la comprobación de esta hipótesis requiere subsecuentes investigaciones.

Gazaryan y Lagrimini (1996) en experimentos con plantas transgénicas de tabaco demostraron que la actividad de peroxididasas está involucrada con la expresión de diferentes fenotipos, semejante a una respuesta tipo auxina, ya que

éstas enzimas juegan un papel significativo en el catabolismo de auxinas a través de la descarboxilación del ac. indolacético; esto, aunado a la participación de las peroxidadas en la síntesis de lignina, suberización y diferenciación, nos da pauta a pensar que la histerina al participar en la actividad de peroxidadas provoque los cambios morfológico de los callos de *P. vulgaris*,

Dado que la histerina tiene los efectos descritos en este trabajo sobre células vegetales normales (callos de *P. vulgaris*) se puede sugerir la posible participación de las lactonas sesquiterpénicas en la morfología y expresión de diferentes fenotipos de las plantas que las sintetizan, sin embargo, para determinar esto último se requieren de otros estudios cómo fue señalado anteriormente. No obstante podemos sugerir que de alguna forma los productos del metabolismo secundario tales cómo las lactonas sesquiterpénicas en plantas, participen regulando mecanismos bioquímicos importantes en el crecimiento, organogénesis, diferenciación y respuesta al estrés. Tal vez éste sea uno de los motivos de la síntesis de incontables metabolitos secundarios en diferentes especies vegetales y que además éstos cambien con respecto a presiones ambientales, así, parece ser que éstos productos son mucho más importantes que lo que la evidencia experimental ha mostrado hasta ahora. Además, cabe aclarar que la información que relacione a los metabolitos secundarios en procesos fisiológicos como el presentado en este trabajo son pocos.

Dentro de la fisiología vegetal es muy interesante continuar con investigaciones que relacionen la actividad específica de metabolitos secundarios

en la planta que los sintetiza y así conocer más de su biología, ¿por qué una planta es erguida o rastrera?, o tal vez ¿por qué? unas son más resistentes que otras a agentes patógenos y muchas otras preguntas que involucran diversos mecanismos; sin conformarnos sólo con la utilidad inmediata que se les puede dar. Las respuestas de de las preguntas que se plantearon anteriormente (entre otras) pueden ser de mucha ayuda en todas las ramas de la biología vegetal.

Toxicidad en *Artemia salina*

En este ensayo la toxicidad de la histerina sobre el crustáceo resultó ser mayor a 200 µg/ml.

Los resultados muestran una gran diferencia en la citotoxicidad de la histerina en tres diferentes sistemas: a) en cultivo de células animales de las líneas Hep2c con CL₅₀ de 1 µg/ml y L929 CL₅₀ entre 5 y 10 µg/ml (Taboada *et al.* 1986), b) en cultivo de tejidos vegetales sobre *P. vulgaris* que a pesar de que no se determinó la CL₅₀, se observan cambios significativos de citotoxicidad desde concentraciones de 75 µg/ml y c) en *A. salina* mayor la CL₅₀ es mayor a 200 µg/ml.

Muchos investigadores proponen el bioensayo con *A. salina* como un método para detectar una amplia actividad biológica, incluyendo citotoxicidad, sin embargo se observa que no es constante respecto a ésta actividad. Si tomamos en cuenta el hecho de que aún entre líneas celulares existen diferencias con productos

que les son citotóxicos a unas, pero a otras no, lo es mas con sistemas completamente diferentes que involucran a organismos completos cómo lo es la larva del crustáceo. No obstante, parece existir una relación, con compuestos citotóxicos de la linea celular 9Ps (leucemia murina *in vivo*) y los resultados de citotoxicidad en *A. salina* (Meyer, 1982). Si esto es cierto la histerina tiene una CL50 mayor a 200 µg/ml en la linea 9Ps.

Se ha mostrado que el método mas confiable para probar productos citotóxicos que pretendan ser utilizados cómo agentes antitumorales, es con lineas celulares, particularmente malignas, sin embargo este método no garantiza que *in vivo* el comportamiento citotóxico de éstos compuestos sea antitumoral.

Es un hecho la importancia que tienen los bioensayos rápidos, simples y poco costosos, para poder ser usados en países con pocos recursos económicos y gran diversidad vegetal; probablemente el sistema de cultivo de tejidos vegetales pueda ser un bioensayo destinado a detectar productos con actividad citotóxica con fines terapéuticos en humanos.

Queda abierta la posibilidad de continuar con investigaciones relacionadas en determinar citotoxicidad de productos naturales sobre células tumorales vegetales (cómo lo es el bioensayo propuesto por Ferrigini , 1982) como complemento a este trabajo y así poder comparar , los resultados obtenidos en los cuatro bioensayos: células vegetales normales (callos), células vegetales tumorales, células animales normales y células animales tumorales.

CONCLUSIONES

- La histerina en concentraciones desde 75 a 225 $\mu\text{g/ml}$ inhibe el crecimiento significativamente en callos de *Phaseolus vulgaris* L.
- La histerina retarda crecimiento en callos de *P. vulgaris* L. No se encontró histerina en los medios de cultivo con concentraciones de 175, 200 y 225 $\mu\text{g/ml}$, las cuales corresponden a los tubos en donde había explantes que no formaron callo o este último era muy pequeño. Esto parece indicar que la división celular comienza cuando el explante ha metabolizado la lactona agragada.
- La histerina en los medios de cultivo, disminuye la actividad de peroxidasas en callos inducidos de *P. vulgaris* y el patrón isoenzimático de peroxidasas en los callos que crecieron en medios con histerina fue diferente al obtenido en los controles, lo que indica que ésta lactona participa en mecanismos en los cuales están involucradas las peroxidasas, modificando así la morfología y crecimiento de los callos
- La CL₅₀ sobre *Artemia salina* fue mayor a 200 $\mu\text{g/ml}$, concentración significativamente mayor que las reportadas en células animales (Hep2c y L929).

REFERENCIAS

- Alarcón M., Callegari L. J., and H. Werner (1990) *Glaucólido B, a molluscida Sesquiterpene Lactone and other Constituents of Vernonia eremophila* Planta Med. 56: 271-273
- Abad M. J., Bermejo P., Valverde S. and A. Villar_ (1994) *Anti-Inflammatory Activity of hydroxyalchillin a Sesquiterpene Lactone from Tanacetum microphyllum* Planta Med. 60 : 228-231
- Blakeman M., and P. Atkinson (1979) *Antimicrobial properties and possible role in host-pathogen interactions of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone isolated from glands Crysanthemum parthenium* Physiol. Plant. Pathol. 15: 183-192
- Cassab G. J. and J.E. Varner (1988) *Cell Wall Proteins* Ann. Rev. Plant. Physiol. 39 : 321-353
- Cassady J.M. and M. Suffness (1980) In: "Anticancer agents Based on Natural Products Models" J.M. (Ed) Cassady and J.D. Dourous, Academic Press, London
- Colegate S. M. and R.J Molyneux (1993) *Bioactive Natural Products* Press Boca Rato. 196-201
- Cortelazzo A., Marais M-F., Joseleau J-P. (1996) *Changes in peroxidases in the suspension culture of Rubus fruticosus during growth* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 27-33
- Church D. L. and A. W. Galston (1987) *Expression of isoperoxidases in Zinnia mesophyl cells differentiatig to tracheary elements in vitro* Plant. Physiol. Suppl. 83:446

- Cruz Reyes, Chavarín C., Campos A., Taboada J. and M. Jiménez (1989) *Actividad Molicicida del Piquero-A aislado de Piqueria trimerou (compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados*. Mem. Inst. Oswald Cruz, Rio de Janeiro 84 : 35-40
- Del Grosso E., Grazia, S. and A.C. Maraldi (1987) *Peroxidase Activity in Phaseolus vulgaris Seedling Tissues and Callus Culture: a Comparison of Genotypes and Developmental Stages*. Environ. Exp. Bot. 27: 387-394
- Espelie K. E., Franceschi V.R. and P. Kolattukudy (1986) *Immunocytochemistry localization and time course of appearance of an antionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue*. Plant Physiol. 81: 487-492
- Essam A. S., Galal A.M. and G.S. Mossa (1996) *Antitumor Germacranolides from Anvillea garcinii*. J. Nat. prod. 59:403-405
- Ferrigni N.R., Putnam J.E., Anderson B., Jacobsen L.B., Nichols D.E., Moore D.S. and J.L. McLaughlin (1982) *Modification and evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of euphorbiaceae seeds*. J. Nat. Prod. 45: 679-686
- Fisher (1979) in *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* (Ed) W. Herz H. Grosback and G. W. Kirby. Springer, Wien. 38: 47-90
- Floris G., MedDa R. and A. Rinaldi (1984) *Peroxidase from Euphorbia characias latex: purification and properties*. Phytochem. 23: 953-956
- Floris G., Medda R. and A. Rinaldi (1984) *Peroxidase from Ipomea batatas seedling: purification and properties*. Phytochem. 23: 1527-1529

- Gazaryan I.G. and L.M. Lagrimini (1996) *Tabacco anionic peroxidase overexpressed in transgenic plants: aerobic oxidation of indole-3-acetic-acid* Phytochem. 42:1271-1278
- Geoffrey L. (1995) *Principles of Biochemistry* W.M. C. Brown Publishers vol. 1
- GiorDano O.S., Guerreiro E., Pestchanker M.J. (1990) *The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones* J. Nat. Prod. 53: 803-809
- Guardia J. and J.A. Guzman (1994) *Mucussynthesis and sulfhydryl groups in citoprotection mediated by dehidroleucodine, a sesquiterpene lactone* J. Nat. prod. 57:507-509
- Guerrero C., Ortega A., Camino M. y J. TaboaDa (1990) *Grandifloridas A y B de Cornuta grandiflora (CHAM SHAUER)* Rev. Latinoamer. Quim. 2: 88-90
- Gutiérrez C. *Aislamiento y purificación de 6-epi-desacetil-laurenobolida extraída de Montanoa grandiflora y determinación de su(s) actividad(es) biológicas.* Tesis para obtener el título de Biólogo UNAM México D.F. 1994
- Gulaçti T., Oksuz S. Hui-Ling S., Cordel G.A.,Pezzuto J.M.and C. Bozok-Johansson (1993) *Citotoxic and antibacterial sesquiterpenes from Inula graveolens* Phytochem. 33: 407- 410
- Hall I.H., Starnes C.O., Lee K.H. and T.G. Waddell (1980) *Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents* J.Pharm. Sci. 69: 537- 543
- Herbert R. (1989)*The biosynthesis of secondary metubolites* (Ed) Chapman and Hall N.Y. USA

- Hurtado D. y M.E. Merino (1987) *Cultivo de tejidos vegetales* (Ed) Trillas, México
- Ingermarson B.S.M. (1995) *Ethylene effects on peroxidases and cell growth patterns in Picea glitics hypocotyl cuttings* *Physiol. Plantarum* 94: 211-218
- Inoue A. (1995) *Antifungal melapdiides from leaf extracts of Smallanthus sonchifolius* *Phytochem.* 39: 845-848
- Kery Á (1993) *Development and application of a complex screening methods for the study of biologically active sesquiterpenelactones* *Planta Medica* (supplement issues) 59:A579-A580
- Klayman D. L., Lin A.J., Acton N., Hoch J.M., Milhous W.K., Theoharides D. and A.S. Dobek (1984) *Isolation of artemisinin (qinghaosun) from Artemisia annua growing in the in the United Estates* *J. Nat. Prod.* 47: 715- 717
- Kwak S.S., Kim S.K., Lee M.S., Jung K.E., Park I.H. and J.R. Liu (1995) *Acid peroxidases from suspension cultures of sweet potato* *Phytochem.* 39: 981-984
- Kowalewsky Z., Keddzia W. and H. Komiar (1976) *Action of helmin on microorganisms* *Arch. Inm. Ter. Exp.* 24: 121-125
- Kupchan S. M. (1970) *Tumor inhibitors recent advances in the chemistry of terpenoid tumor inhibitors* *Pure. Appl. Chem.* 21: 227-246
- Kupchan S.M., Eakin M.A. and M. Thomas (1971) *Tumor inhibitors. 69. Structure-Cytotoxicity relationship amog the sesquiterpene lactones* *J. Med. Chem.* 14: 1147- 1152

- Laemmly U.K.** (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227: 680-685.
- Lee K.H., Ibuta T., Wu R.Y. and T.A. Geissman** (1977) *Structure antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds* Phytochem. 16: 1177-1181
- Lucas R.A., Rovinsky S., Kiesel R.J., Dorfam. L. and H.B. McPhyillamy** (1964) *Sesquiterpene lactone with analgesic activity from Helium* J. Org. Chem. 1549-1554
- Lagrimini L.M. and S. Rothstein** (1987) *Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection* Plant. Physiol. 84: 438-442
- McLaughlin J.L.** (1991) *Crown gall tumours on potato disc and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation* Methods in plant biochemistry Academic press New York 1-32
- Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Nichols D.E. and J.L. McLaughlin** (1982) *Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents* Planta Medica 45: 31-34
- Misra R. and R.C. Pandey** (1981) in: *Antitumor compound of Natural Origin: Chemistry and Biochemistry* (Ed) Aszalos CRC Press Boca Ration 2 : 145-192
- Mok M. and D.W.S. Mok** (1977) *Genotypic responses to Auxins in Tissues Cultures of Phaseolus* Physiol Plant. 40: 261- 264

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Murashige T. and F. Skoog (1962) *Arevised medium for rapid growth and bioessays with tobacco tissue cultures* Physiologia Pl. 15: 473-497**
- Padiglia A., Cruciani E., Pazzaglia G., MedDa R. and G. Floris (1995) *Purification and Characterization of Opuntia peroxidase* Phytochem 38: 295-297**
- Pentalino J.F. and G.B. Collins (1995) *Manganese Toxicity in Tobacco (Nicotiana tabacum L.) Callus and seedlings* J. Plant. Physiol. 118: 139-144.**
- Pettit G.R. (1977) *Biosynthrtic Products for Cancer Chemotherapy* (Ed) Plenum Press, New York**
- Picman A.K. (1986) *Biological activities of sesquiterpene lactones* Biochem. System. Ecol. 14: 255-261**
- Picman A.K. and G.H.N. Towers (1983) *Effects of the sesquiterpene lactone, helenin on feeding rates and survival of the tundra redback vole Clethrionomys rutilus* Biochem. System. Ecol. 11: 321-327**
- Picman A.K. and J. Picman (1984) *Effect of the selected Pseudoguaianolides on survival of the flour beetle, Tribolium confusum* Biochem. System. Ecol. 12: 89-93**
- Piqueras A., Hernández J., Olmos E., and F. Sevilla (1996) *Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45: 53- 60**
- Rodriguez E., Towers G.H.N. and J.C. Mitchell Review (1976) *Biological Activities of Sesquiterpene Lactones* Phytochem. 15: 1573-1580**

- Rodriguez M.J. and van R.B. Huystee (1994) *Plant peroxidases: Interaction between their prosthetic groups* Phytochem. 37: 1217-1225
- Romo de Vivar A. (1985) *Productos Naturales de la Flora Mexicana* (Ed) LIMUSA México
- Romo de Vivar A., Bratoeff E.A. and T. Ríos (1966) *Structure of Hysterin, a new sesquiterpene lactone* J. Org. Chem. 31: 673-677
- Rzedowsky J. (1985) *Flora fanerogámica del Valle de México* (Ed) Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto de Ecología México 2: 620
- Seely J., Borst W., King G., Hannan P. and D. Maddocks (1995) *Glutamine synthetase activity, ammonium accumulation and growth of callus cultures of Asparagus officinalis L. exposed to high ammonium or phosphinothricin* J. Plant. Physiol. 146: 686- 692
- Sato et.al. (1995) *Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured Zinnia cells during tracheary element differentiation* Planta 196: 141-147
- Smith G., Rodgers M.R., Zimmerlin A., Ferdinando D. and G.P. Bolwell (1994) *Tissue and subcellular immunolocalisation of enzymes of lignina synthesis in differentiating and wounded hypocotil tissue of French bean (Phaseolus vulgaris L.)* Planta 192: 155-164
- Swarnkar P.L., Bhora S.P. and N. Chandra (1986) *Biochemical changes during Growth and diferentiation of the callus of Solanum surattense* J. Plant. Physiol. 126: 75-81

- Taboada J., González Diddi y M.J. Tellez (1986) *Estudio de la actividad citotóxica, in vitro, de lactonas sesquiterpénicas aisladas de plantas mexicanas* Primer Congreso Latinoamericano de fitoquímica, Instuto de Química UNAM México D.F.
- Tellez-Martínez J., Taboada J. y M. González-Diddi (1980) *Citotoxicidad de Algunas Lactonas Sesquiterpénicas in vitro* Archivos de la Investigación Médica México 4: 435-443
- Toledo V. (1988) *La diversidad biológica de México* Ciencia y Desarrollo 14: 17-30
- van Huystee R.B. (1987) *Some molecular aspects of plant peroxidase*. Ann. Rev. Plant. Physiol. 38: 205-219
- van Huystee R.B. and W.L. Cairns (1982) *Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development* Phytochem. 21: 1843-1847
- Vinchnewsky W., Sarti S.J. Gilbert B. and W. Herz *Goyazensolide u schistosomicidal Heliangolide from Eremanthus goyazensis* Phytochem. 15: 191-193
- Wagner H. (1983) *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Ed) Academic. Press New York
- Woerdenbag H.J., Merfort I., Paßreiter C.M., Schmidt J., Prass N., Kampligi H.H., and A.W.T. Konings (1994) *Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from Arnica species against the GLC4 and the against COLO 320 cell lines* Planta Medica 60: 434-437

Woerdenbag H.J., Moskai T.A., Prass N. and T.H. Malingré (1993) Cytotoxicity of artemisinin-related endoperoxides to Ehrlich ascites tumor cells J. Nat. Prod. 56: 849-856