



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETECCIÓN DE PÉPTIDOS ESTIMULANTES DEL
CRECIMIENTO CELULAR EN MEDIOS DE CULTIVO
DE *BOUVARDIA TERNIFOLIA*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA:

KATINA ORTEGA FONSECA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Irma Ofelia Bernal Lugo
VOCAL: Profesor: Rogelio Rodríguez Sotres
SECRETARIO: Profesor: Felipe Cruz García
1er. SUPLENTE: Profesor: Juan Gómez Dueñas
2º SUPLENTE: Profesor: Luis Tonatihut Sánchez Linares

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 104 y 116 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E,
Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema:

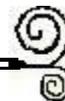
Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo _____

Supervisor técnico:

M.C. María Teresa de Jesús Olivera Flores _____

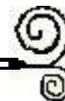
Sustentante:

Katina Ortega Fonseca _____



CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS	v
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
IV. HIPÓTESIS	15
V. OBJETIVOS	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	17
1) PROLIFERACIÓN DE CALLO.	18
2) OBTENCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO.	26
3) AISLAMIENTO DEL COMPUESTO DE NATURALEZA PEPTÍDICA.	26
4) CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO.	28
5) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PÉPTIDO MEDIANTE BIOENSAYO.	36
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
1) MANTENIMIENTO DE CULTIVOS BT.	40
2) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL MEDIO CONDICIONADO.	51
3) CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO.	59



VIII. CONCLUSIONES	70
IX. ANEXO	71
1) PROLIFERACIÓN DE CALLO.	71
2) ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN	72
3) CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO.	73
4) SEPARACIÓN DEL COMPUESTO MEDIANTE HPLC.	76
5) RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹H.	78
X. REFERENCIAS	79



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ejemplo de estructuras complejas de los metabolitos secundarios comerciales.	7
Figura 2.	Esquema general de la producción de metabolitos secundarios.	9
Figura 3.	Diagrama general de estrategia de trabajo.	17
Figura 4.	Establecimiento de células en suspensión (CS) Bt.	20
Figura 5.	Transferencia a medio sólido de microcallos generados en medio líquido.	24
Figura 6.	Diagrama de flujo de los pasos requeridos para la generación de líneas celulares y su inducción a CS.	25
Figura 7.	Obtención de moléculas menores de 10 KDa.	28
Figura 8.	Diagrama de la estrategia usada para la obtención del factor de crecimiento a partir de MC.	35
Figura 9.	Obtención de líneas celulares.	41
Figura 10.	Fotografía de los microcallos en suspensión.	41
Figura 11.	Gráfica de crecimiento de los microcallos de las líneas celulares de Bt.	42



Figura 12.	Desarrollo de microcallo 3Bt.	43
Figura 13.	Líneas celulares y callo heterogéneo.	44
Figura 14.	Apariencia del CS durante 10 días de crecimiento.	45
Figura 15.	Curvas de crecimiento de células en suspensión 3Bt iniciadas con diferente densidad celular.	46
Figura 16.	Curva de crecimiento del cultivo en suspensión de la línea celular 3Bt	48
Figura 17.	Viabilidad celular de cultivos en suspensión de la línea celular 3 Bt.	50
Figura 18.	Efecto del medio condicionado (MC) sobre el crecimiento celular	52
Figura 19.	Efecto del medio condicionado sobre el crecimiento	53
Figura 20.	Intervalos de confianza para Tukey al 95%, diferencia entre los días 1, 8, 14 y 22	55
Figura 21.	Cinética del efecto del medio condicionado en el crecimiento	57
Figura 22.	El efecto de la proteasa en el MC adicionado a las CS de 3Bt	58



Figura 23.	Cromatogramas, HPLC	63
Figura 24.	Espectro de RMN en una dimensión	65
Figura 25.	Espectro de RMN en dos dimensiones	66
Figura 26.	Curva patrón para método de Lowry	74
Figura 27.	Curva patrón para método del BCA	75
Figura 28.	Cromatograma del estándar para péptidos de bajo peso molecular (Sigma Aldrich H 2016)	77
Figura 29.	Curva patrón para método del BCA	78



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Uso de los metabolitos secundarios	6
Tabla 2.	Diversidad química de los productos naturales aislados de cultivos celulares en suspensión	10
Tabla 3.	Problemas presentas durante el escalamiento de la producción de metabolitos secundarios	12
Tabla 4.	Tipos de columnas utilizadas en el análisis	31
Tabla 5.	Mezcla de disolventes para resolver la mezcla de compuestos	32
Tabla 6.	Composición estándar Sigma Aldrich No H2016	33
Tabla 7.	Características de la velocidad de crecimiento de CS	47
Tabla 8.	Anova para densidades y tiempo	54
Tabla 9.	Prueba de Tukey para los diferentes tiempos	55
Tabla 10.	Prueba de Tukey para los diferentes densidades	56
Tabla 11.	Anova para los 3 tratamientos de las células en suspensión	58
Tabla 12.	Volumen de MC colectado	61
Tabla 13.	Parámetros utilizados en la corrida de los péptidos de <i>Bt</i> en HPLC	62
Tabla 14.	Contenido de carbohidratos y proteínas en las fracciones del MC.	68
Tabla 15.	Soluciones stock para medios de cultivo MS	71

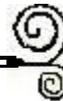
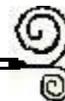


Tabla 16.	Curva patrón Lowry	73
Tabla 17	Stock para buffer de corrida	76
Tabla 18	Buffers de corrida para HPLC	76
Tabla 19	Buffers de corrida para HPLC	77



ABREVIATURAS

- 🌿 **CTV:** cultivo de tejidos vegetales.
- 🌿 **CS:** células en suspensión.
- 🌿 **MC:** medio condicionado.
- 🌿 **2,4-D:** ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
- 🌿 **Medio MS:** medio Murashige y Skoog.
- 🌿 **Rpm:** revoluciones por minuto.
- 🌿 **PT:** proteasa.
- 🌿 **PS:** peso seco.
- 🌿 **PF:** peso fresco.
- 🌿 **BCA:** ácido bicinconínico.
- 🌿 **HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia, por sus siglas en inglés.
- 🌿 **ABS:** absorbancia.
- 🌿 **gl:** grados de libertad.



I. RESUMEN

Las células vegetales en cultivo líquido son una posible alternativa para la obtención de productos secundarios con actividad farmacológica y cuya síntesis química presenta bajos rendimientos o dificultades estéricas. Sin embargo, su uso a nivel industrial se ha visto limitado por la baja tasa proliferativa que presentan estos cultivos. En la actualidad se han aislado y caracterizado dos péptidos de los medios condicionados (MC) de células en suspensión (CS) de *esparragus* y de *arabidopsis*, fitosulfocina (PSK) y péptido de planta sulfatado en la tirosina uno (PSY1), respectivamente (Matsubayashi, 1996; Amano, 2007), que son capaces de incrementar la actividad mitogénica. Sin embargo, en otras especies no se logró estimular la actividad mitogénica de cultivos en suspensión productores de metabolitos secundarios como los de *Taxus* y de *Atropa belladonna* (Kim, 2000; Lee, 1999; Wang, 2002).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar un posible factor con actividad mitogénica en una especie productora de metabolitos secundarios. Para ello, se planteó el uso de medios condicionados (MC) de células de la especie *Bouvardia ternifolia* (Bt), una planta característica de Mesoamérica. Esta especie produce como metabolito secundario la boubardina, un péptido cíclico que inhibe el ciclo celular (Zalacain, 1982).



El trabajo se dividió en dos partes; en la primera se obtuvieron cultivos en suspensión y MC, obtenido durante el mantenimiento de las células en suspensión (CS) y el cual se utilizó como fuente del factor mitogénico. La segunda parte del proyecto correspondió a la identificación del factor de crecimiento activo en la proliferación celular. Para tal fin se fraccionó el MC con filtros de fraccionamiento molecular (menor a 10 KDa). El filtrado con moléculas menores de 10 KDa fue adicionado a células en suspensión, de las cuales se cuantificó su proliferación por peso seco. Los resultados indicaron que el MC contenía un compuesto que estimuló la proliferación celular tres veces respecto del control.



II. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen más de 30000 tipos de compuestos de interés industrial, cuyos usos pueden ser muy diversos: medicamentos, pigmentos, insecticidas, aditivos de alimentos entre otros. Algunos de estos compuestos son difíciles de sintetizar químicamente o los rendimientos de sus fuentes originales son muy bajos, incluso incrementar la cantidad producida por microorganismos a través de ingeniería genética no se logra (Amano, 2007).

Por lo anterior, se ha propuesto el uso de cultivos celulares como un método de producción de metabolitos específicos y de utilidad industrial. Los cultivos de células vegetales han demostrado ser un método útil para la producción de metabolitos secundarios pero debido a problemas biológicos y operacionales, en la actualidad solo hay tres procesos industriales en operación que utilizan la tecnología de cultivo de células vegetales en la producción de shikonina, paclitaxel y ginseng (Wilson, 2012; Woragidbumrun, 2001; Yao, 1999).

La baja tasa de proliferación que presentan las células vegetales en cultivo constituye uno de los problemas biológicos que limitan la utilización de esta tecnología a nivel de proceso industrial.



Con la finalidad de contribuir a resolver esta limitación en este trabajo se estudió el efecto del MC en la proliferación celular, ya que la secreción de factores proliferativos a los medios de cultivo contribuye al incremento de la misma en células vegetales (Matsubayashi, 1996).



III. ANTECEDENTES

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular, muy importantes en la adaptación de las plantas con su medio ambiente y su interacción con el ecosistema, además de jugar un papel muy importante en la reproducción vegetal. En la actualidad, muchos de estos compuestos han sido aislados, se ha determinado su estructura química, en algunos casos su síntesis química ha sido establecida, y se han estudiado sus propiedades biológicas. A partir de estos estudios los metabolitos secundarios se utilizan como agroquímicos, saborizantes, fragancias, colorantes, pesticidas, aditivos alimenticios, saborizantes, plaguicidas y fármacos (Tabla 1).



Tabla 1. Uso de los metabolitos secundarios (Calva, 2002).

Industria	Producto	Planta	Aplicación
Química	Shikonina	<i>Lithospermum erythrozon</i>	Precursor de antraquinonas
	Solasodina	<i>Solanum chryotrichum</i>	Síntesis de esteroides
Farmacéutica	Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
	Quinina	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Antipalúdico
	Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico
Alimenticia	Shikonina	<i>Lithopermum erythorhizon</i>	Pigmento
	Capsaicina	<i>Capsicum spp</i>	Saborizante

La importancia de los metabolitos secundarios en la industria farmacéutica es tal que el 25% de los medicamentos actuales proceden de productos naturales, obtenidos de plantas medicinales (Ramachandra, 2002).

Muchos de los metabolitos secundarios son producidos a través de la síntesis química, pero otros debido a su complejidad estereoespecífica requieren ser obtenidos de su fuente original. Un ejemplo es la vainilla (Figura 1 a) el saborizante más popular, pero menos del 1% de la demanda anual es obtenida a través de la extracción de la *vanilla planifolia* (Wilson, 2012). Una limitación de



la síntesis química es la presencia de centros quirales, otros ejemplos que presentan problemas similares son los alcaloides morfínicos que presentan cinco centros quirales (Figura 1 b, c y d), o el paclitaxel (Figura 1 e), cuya síntesis total, involucra cerca de 40 reacciones que utilizan solventes tóxicos además de que su rendimiento es bajo y por tanto, la utilización de esta vía para obtener paclitaxel resulta ser, por tanto, costosa y ambientalmente desfavorable.

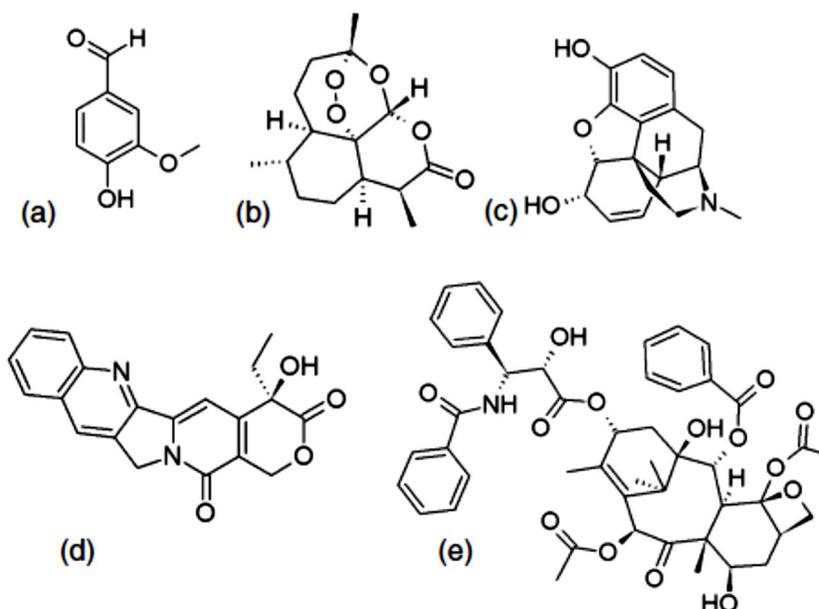


Figura 1. Ejemplos de estructuras complejas de los metabolitos secundarios comerciales (a) vainillina, (b) artemisina, (c) morfina, (d) camfocina y (e) paclitaxel.

En general, los metabolitos secundarios representan el 1% del peso seco de las plantas, por lo que la extracción resulta poco práctica. Por ejemplo, se requieren 340 000 Kg de la corteza de *taxus* ó



38000 árboles para satisfacer la demanda de 25 Kg por año del anticancerígeno paclitaxel (Wilson, 2012). No obstante, la cosecha es limitada debido a su disponibilidad, la abundancia de la especie y la velocidad de crecimiento, aunado a que las plantas originarias de la biósfera pueden tener problemas con el crecimiento fuera de su ecosistema, lo que es muy común en las plantas que no resisten los cambios debido a los patógenos (Ramachandra, 2002). Por lo anterior, se han desarrollado y estudiado la producción de metabolitos secundarios mediante diversas estrategias usando sistemas *in vitro*, con el objetivo de mejorar la producción de metabolitos secundarios preservando la flora y el equilibrio de los ecosistemas (Wilson, 2012), una de ellas son los cultivos de células vegetales.

1) Cultivos de células vegetales.

Los cultivos celulares vegetales pueden ser crecidos y proliferados en bioreactores, para la producción de metabolitos secundarios, de una manera similar a la producción industrial de compuestos utilizando hongos o bacterias (Figura 2).

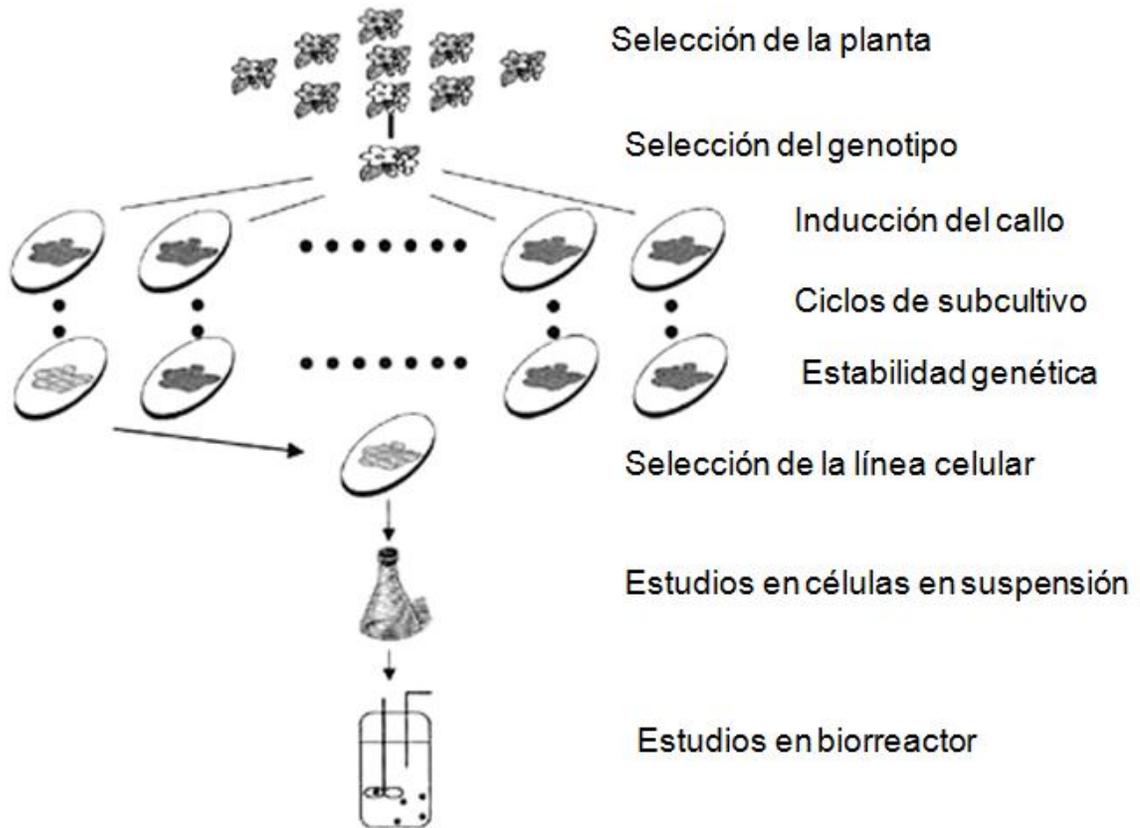


Figura 2. Esquema general de la producción de metabolitos secundarios por medio de cultivos de células vegetales (Bourgaud, 2001).

Esta posibilidad fue plenamente demostrada por Zenk y sus colaboradores en 1976, quienes lograron establecer cultivos de células en suspensión de *Catharanthus roseus* capaces de producir serpentina y ajmalicina, dos alcaloides del indol característicos de esta planta (Zenk, 1977). La Tabla 2 muestra otros compuestos que se han generado en cultivos en suspensión.



Tabla 2. Diversidad química de los productos naturales aislados de cultivos celulares en suspensión (Rao, 2002).

Fenilpropanoides	Alcaloides	Terpenoides	Quinonas
Antiocininas	Acridinas	Carotenos	Antroquinonas
Cumarinas	Betalainas	Monoterpenos	Benzoquinonas
Flavonoides	Quinolizidinas	Sesquiterpenos	Naftoquinonas
Isoflavonoides	Isoquinolinas	Diterpenos	
Lignanós	Índoles	Triterpenos	
Fenoles	Purinas		
Taninos	Piridinas		

La producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales tiene algunas ventajas sobre la agricultura convencional:

- 🌿 Son independientes de la zona geográfica, de la variación de estación y de los factores ambientales.
- 🌿 Ofrecen un sistema de producción definida, lo cual asegura el suministro continuo de productos, con calidad y rendimientos uniformes.
- 🌿 Es posible producir nuevos productos que normalmente no se encuentran en las plantas.
- 🌿 Producción rápida.



- Las células vegetales pueden realizar transformaciones estereo y regio específicas para la producción de nuevos compuestos y precursores más baratos.

Con la finalidad de mejorar los rendimientos de productos naturales sintetizados por las células en cultivo, en los últimos años se han desarrollado diversas estrategias (Bourgaud, 2001).

- Obtener líneas celulares con alta producción de metabolitos secundarios y de rápida proliferación.
- Mutación de células.
- Inmovilización de las células para mejorar la secreción del producto y por tanto el rendimiento.
- Uso de elicitors para el mejoramiento de la productividad en un corto periodo de tiempo.
- Permeabilizar las membranas para facilitar el proceso de salida de los metabolitos secundarios al medio de cultivo.
- Adsorción de metabolitos para evitar la inhibición de la síntesis por retroalimentación.
- Cultivo de células a gran escala en el bioreactor adecuado.

Aunque la tecnología de cultivo de tejidos permite la producción de metabolitos secundarios, todavía hay problemas biológicos y operacionales que se presentan al escalar el bioproceso (Tabla 3).



Tabla 3. Problemas presentes durante el escalamiento en la producción de metabolitos secundarios en cultivos en suspensión de células vegetales (Fowler, 1992).

Biológicos	Operacionales
Baja actividad mitogénica	Adhesión celular
Heterogeneidad fisiológica	Requerimiento de luz
Inestabilidad genética	Agitación
Bajo contenido de metabolitos	Sensibilidad al estrés por cizallamiento
Secreción de productos	Condiciones asépticas

Los problemas operacionales descritos en la Tabla 3, surgen de las características particulares que poseen las células vegetales, por ejemplo; aisladas típicamente presentan un diámetro entre 20-40 micrómetros. Sin embargo, al dividirse las células quedan unidas por la pared celular formando agregados que pueden llegar a medir varios milímetros, provocando que la difusión del oxígeno y los nutrientes permitan el desarrollo de microambientes dentro de los grandes agregados. Además, por su gran tamaño y su rigidez los agregados son muy sensibles al estrés por agitación (Fowler, 1992).

Las limitaciones anteriores son responsables de los pocos procesos a nivel industrial, que en la actualidad se han desarrollado. Los metabolitos secundarios cuya producción industrial se realiza por tecnología de cultivos de células vegetales son: shikonina, ginsen y paclitaxel (Wilson, 2012; Woragidbumrun, 2001; Yao, 1999). Entre las posibles causas que generan los problemas biológicos



mencionados en la Tabla 3 se encuentra la desdiferenciación que sufren los tejidos en el establecimiento de los cultivos en suspensión. Los tejidos vegetales están formados por diversos tipos celulares y esta heterogeneidad podría mantenerse durante el desarrollo y mantenimiento del cultivo. La edad del cultivo también podría influir en la producción cuantitativa de metabolitos secundarios. Por ejemplo, se han observado grandes variaciones en la acumulación del paclitaxel a medida que el cultivo envejece (Kim, 2006).

Con excepción de la baja actividad mitogénica, las otras limitaciones biológicas se podrían resolver mediante diversas estrategias (Dörnenburg, 1995) incluso algunas de ellas se han aplicado exitosamente para algunos cultivos celulares (Ramachandra, 2002). De lo anterior se desprende que a la fecha no se haya desarrollado ninguna estrategia para resolver el problema de la baja tasa mitogénica de las células en suspensión.

En cultivos *In vitro*, el crecimiento celular de poblaciones de baja densidad (menores 10^5 células·mL⁻¹) no presentan actividad mitogénica aunque las células permanecen viables, sin embargo, la actividad proliferativa es activada por la adición de MC, proveniente de cultivos celulares que presentan alta proliferación celular (Matsubayashi, 1996). Este fenómeno puede ser explicado por la secreción de un factor mitogénico presente en el MC.



En la actualidad, sólo se han aislado dos diferentes péptidos mitogénicos secretados al MC: Fitosulfoquina y PSY1 (péptido de planta sulfatado en la tirosina uno). El primero se aisló de cultivos de células mesofílicas de *Asparragus*, el segundo de células en cultivo de *arabidopsis*. Ambos péptidos están sulfatados en la tirosina y PSY además está arabinosilado en una hidroxiprolina (Amano, 2007), estas modificaciones post-traduccionales son importantes para su actividad biológica. Sin embargo, cuando PSK fue adicionado a células en cultivo de *Taxus s.p.*, se observó un ligero incremento en los niveles de síntesis de los metabolitos secundarios, debido a una estimulación en su metabolismo, pero no hubo efecto sobre la proliferación celular (Kim, 2006). Lo anterior sugiere que los factores mitogénicos de los cultivos de células productoras de metabolitos son diferentes a los ya reportados, ya sea en su naturaleza química o en la secuencia de aminoácidos.

Integrando el conocimiento actual de la tecnología de cultivo de células vegetales y el conocimiento de los péptidos mitogénicos, se cuentan con las herramientas necesarias para definir alguna estrategia que incremente la proliferación de células vegetales en cultivo.



IV. HIPÓTESIS

Las células vegetales productoras de metabolitos secundarios; como *Bouvardia ternifolia*, secretan compuestos mitogénicos al medio condicionado. De ser así, la adición de estos factores a un cultivo de celular de baja densidad incrementará la proliferación de las células en suspensión o bien reducirá el periodo de adaptación antes de entrar a la fase log de las células en cultivo.



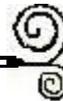
V. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la presencia de un factor mitogénico en los medios condicionados de células de *B. ternifolia*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar y proliferar líneas celulares de *B. ternifolia* en callos.
- Establecer células en suspensión de *B. ternifolia*, así como de las líneas celulares.
- Obtener medio condicionado de las células en suspensión para el aislamiento de factores con posible actividad mitogénica.
- Realizar un bioensayo en el que se demuestre el crecimiento de las células en presencia del factor autócrino.
- Purificar el compuesto y determinar su naturaleza química.



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Como ya se mencionó este trabajo se realizó en dos etapas: la primera se consistió en proliferar y mantener el callo, así como establecer líneas celulares y cultivos en suspensión. La segunda se enfocó al aislamiento e identificación del factor de crecimiento, como se muestra en el diagrama de la Figura 3.

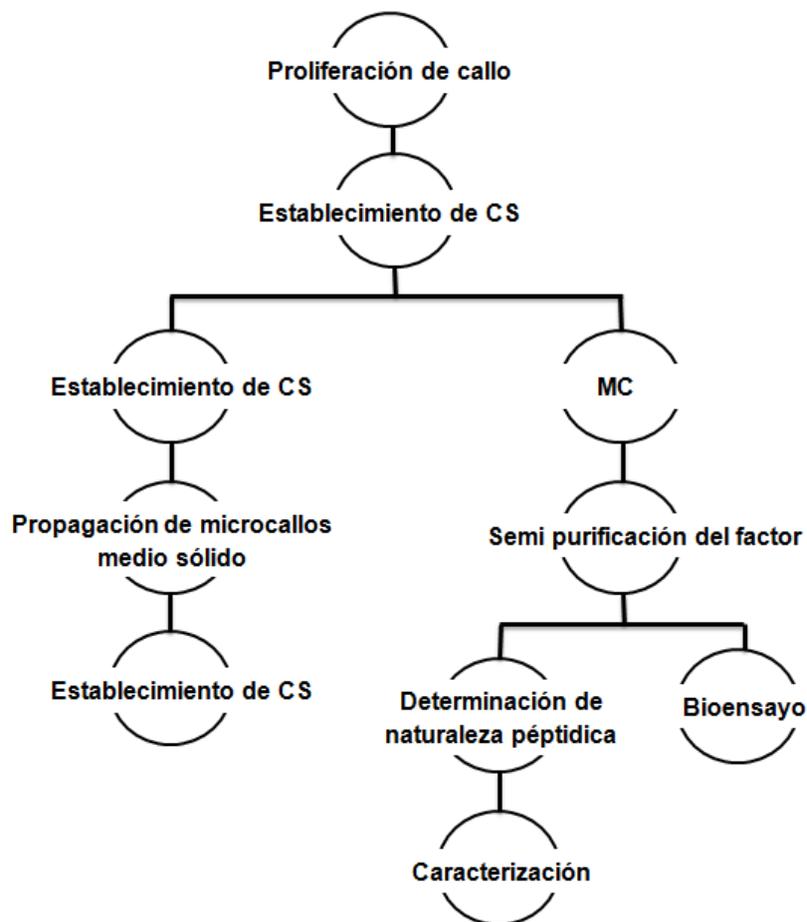


Figura 3. Diagrama general de estrategia de trabajo.



1) PROLIFERACIÓN DE CALLO.

1.1) Material vegetal.

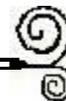
Se utilizaron cultivos de callo *Bt* previamente establecidos a partir de hojas. Los callos fueron subcultivados en medio MS suplementado con diferentes compuestos orgánicos (Anexo 1).

1.2) Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100X, usando las sales inorgánicas MS así como los reguladores de crecimiento 2-4 D; kinetina, glicina y vitaminas R2. El medio fue suplementado con $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa como fuente de carbono, el pH se ajustó a 5.73 con NaOH 1N o HCl 1N, según fuera necesario. Para el uso de medio sólido se agregó $3.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de gellan como gelificante (Anexo 1.1).

1.3) Subcultivo de callo.

El subcultivo se realizó periódicamente, aproximadamente cada mes. El material biológico subcultivado tenía una característica muy importante, no estaba oxidado, para lo cual se retiró el callo que presentase una coloración oscura o que estuviese seco. Una vez que se separó, el callo no oxidado se subcultivó en $1/3$ ó $1/2$ de la



superficie del medio, para favorecer el crecimiento del callo y evitar la oxidación.

1.4) Establecimiento de cultivos en suspensión.

Se inocularon 4 g de callo (heterogéneo o líneas celulares) en 60.0 mL del medio de cultivo MS antes descrito en un matraz de 250 mL, el cual fue sellado perfectamente con un tapón de silicón (Sigma Aldrich CAS No C 1046-56-6) o con papel aluminio y se colocó en condiciones de incubación (anexo 2.1) donde permaneció en agitación constante durante 7 días. Transcurridos los 7 días, en condiciones de asepsia el cultivo en suspensión se tamizó por una malla 50 (Sigma Aldrich Núm. Catálogo S0895), este medio con células finas fue recolectado en un vaso de precipitados estéril. El sobrenadante se filtró por segunda vez a través de una malla de 100 (Sigma Aldrich Núm. Catálogo S3895) y se recogió en un matraz de 250 mL. El cultivo se mantuvo en el cuarto de incubación donde se agitó durante 10 días, transcurrido este tiempo en condiciones de asepsia, las células del matraz se resuspendieron y se retiraron 30 mL del cultivo (MC), los cuáles se colectan. Finalmente se adicionaron 30 mL de medio fresco al matraz que contenía las CS, a este procedimiento le denominamos mantenimiento del cultivo en suspensión, Figura 4.

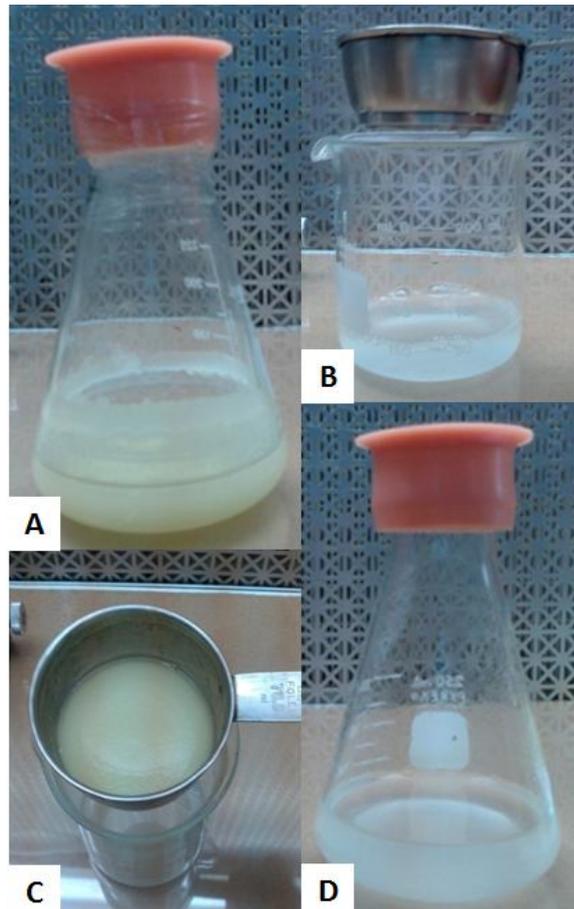


Figura 4. Establecimiento de CS para Bt. **A)** CS densas, **B)** filtración de CS, **C)** agregados celulares retenidos en el tamizador, **D)** CS células finas.

1.5) Morfología y viabilidad de las células en suspensión.

En un tubo de 2 mL se colocó una alícuota del CS recién agitado y se centrifugó (centrifuga Eppendorf modelo S415C) a 1 000 rpm, durante 1 min. El sobrenadante fue retirado y la pastilla se resuspendió en 0.50 mL de azul de tripán (0.1%) (Sigma Aldrich No catálogo T8154) o bien en 0.50 mL de fluoresceína (1 %) (Benítez,



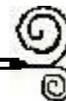
2009) en ambos casos se incubaron por 15 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 15 μ L y se colocaron en un portaobjetos. En ambos casos las células se observaron con un Microscopio de Fluorescencia Olympus Bx51, en el Laboratorio de Microscopia, ubicado en el conjunto “E” de la Facultad de Química, UNAM. En el caso de las células teñidas con fluoresceína las fotografías se tomaron tanto en el campo claro como en el fluorescente. El objetivo con el que se tomaron las fotografías fue 10X. Para conocer el porcentaje de viabilidad se dividió el número de células vivas entre el número total de células mediante la siguiente fórmula:

$$Viabilidad = \frac{\text{células vivas}}{\text{número de células totales}} \times 100$$

Ecuación 1 Viabilidad de las células

1.6) Determinación de la densidad celular en los cultivos en suspensión.

En un vaso estéril bajo condiciones de asepsia, se vertió el CS recién diluido con medio fresco y se agitó lentamente con un agitador magnético sobre una parrilla durante 30 min, para lograr que las células se resuspendieran homogéneamente. Posteriormente con una pipeta cuya punta fue cortada, se tomó 1 mL de CS, se filtró al vacío durante 1:30 min, en un crisol gooch



que contenía papel filtro Whatman # 4, previamente pesado. El papel filtro se retiró y se determinó el peso de la muestra por diferencia. Con el peso y sabiendo el volumen inicial del filtrado se obtuvo la densidad en $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Ecuación 2).

$$\text{densidad} = \left[\frac{(\text{peso papel} + \text{muestra}) - \text{peso papel}}{\text{volumen total de muestra}} \right]$$

Ecuación 2. Calculo de la densidad celular

1.7) Curva de crecimiento en medio líquido.

Una vez determinada la densidad celular del cultivo en condiciones de asepsia, en matraces de 25 o 50 mL se colocó la densidad celular deseada más el volumen de medio de cultivo MS para completar un volumen de 5mL. Los matraces se taparon con papel aluminio colocándose en condiciones de incubación. Cada punto de la curva se realizó por triplicado. El muestreo se realizó cada tres días.

Para determinar el crecimiento celular, el contenido de cada matraz se filtró al vacío en crisoles Gooch conteniendo papel filtro whatman N°4. Cada filtro con células se llevó a peso constante. El crecimiento celular ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) se calculó utilizando la Ecuación 2.

1.8) Obtención de microcallos para líneas celulares.



Transcurrido un mes de iniciado el cultivo, en una de las suspensiones celulares se observó la formación de microcallos, por lo que se decidió pasarlos a medio sólido con el fin de generar líneas celulares. Para ello, en condiciones de asepsia el matraz que contenía los microcallos se filtraron las CS en el dispersor celular con la malla de 50. Los pequeños microcallos que se retuvieron en la malla, fueron colocados cuidadosamente en frascos con medio sólido MS y se pusieron en el cuarto de incubación (Anexo 2.2) (Figura 5).



Figura 5. Transferencia a medio sólido de microcallos generados en medio líquido.

El crecimiento de 1 mm a 2 cm, de los callos duró aproximadamente 6 meses. Los microcallos fueron seleccionados de acuerdo a la velocidad de crecimiento observada. Los que presentaban una velocidad semejante se reunieron, generando así 3 líneas celulares.

1.9) Propagación de microcallos en medio sólido.

Las nuevas líneas celulares al igual que el callo heterogéneo se hicieron crecer en medio MS descrito anteriormente Figura 6.



Debido a que en un principio los microcallos eran de menos de un gramo, los subcultivos se realizaron cada mes y medio, una vez que se tuvo el material suficiente, se subcultivaron cada mes.

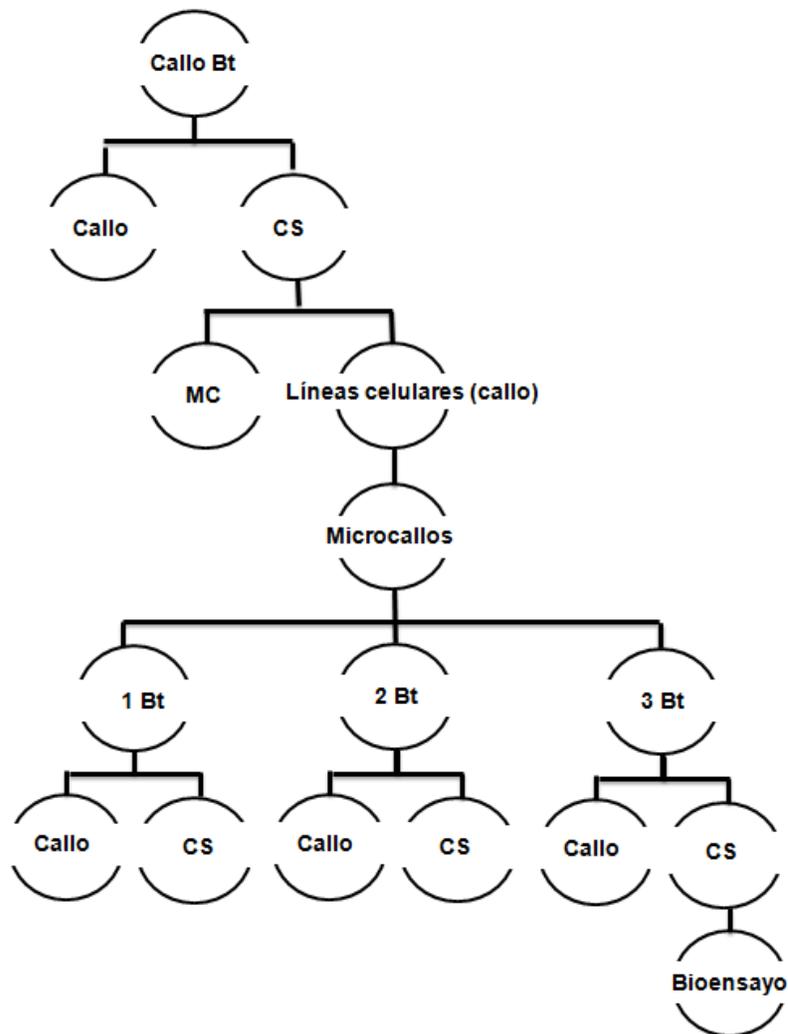


Figura 6. Diagrama de flujo de los pasos requeridos para la generación de líneas celulares y su inducción a CS.



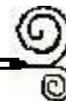
2) OBTENCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO.

Como se mencionó en el apartado 1.4, cada 10 días se resuspendieron los cultivos en suspensión y se dividieron en dos. Una mitad se colectó y a la otra se le adicionaron 30 mL de medio de cultivo fresco. En cada ocasión las células del matraz se dejaron reposar por 30 min, pasado este tiempo las células se colectan en el fondo del matraz y por decantación se recogieron en un vaso de precipitados, aproximadamente 30 mL del medio. Al matraz con el cultivo se le adicionó el mismo volumen del medio decantado. El medio de cultivo en el vaso de precipitados se denomina medio condicionado (MC).

3) AISLAMIENTO DEL COMPUESTO DE NATURALEZA PÉPTIDICA.

3.1) Liofilización de la muestra.

El MC decantado se filtró dos veces, para retirar las células finas que se pudieron haber quedado durante la decantación, en papel filtro Whatman # 1 y fue colocado en un recipiente de plástico para posteriormente congelarse a -80°C . El MC congelado fue liofilizado en una liofilizadora LABCONCO LYPH LOCK 6, hasta que la muestra disminuyó su volumen de 5 a 10 veces (Figura 7).



3.2) Diálisis de la muestra.

El MC concentrado se dializó en una membrana de 10 KDa (Spectra 7). La diálisis de la muestra se puede realizar de dos formas, con un volumen de 4 L de agua desionizada en agitación constante durante 12 h o cambiando el agua de diálisis cada 2 h tres veces consecutivas. Con lo que disminuyó la concentración de sales y otros compuestos de menor peso molecular (Figura 7).

3.3) Ultrafiltración de la muestra.

Una vez que se tuvo el MC dializado y liofilizado, se filtró a través de un Corning Spin-X UF 6 de 10 KDa, en el cual se colocaron 5 mL de muestra y se centrifugó a 5 000 rpm durante una hora (centrifuga BECKMAN COULTER Allegra 64). En la parte superior del filtro (1ml) se concentraron moléculas de un peso mayor a 10 KDa, mientras que en la parte inferior corresponde a los compuestos de menor peso molecular. El filtrado que contenía moléculas menores o igual a 10 KDa, fueron utilizados para el resto del trabajo (Figura 7).

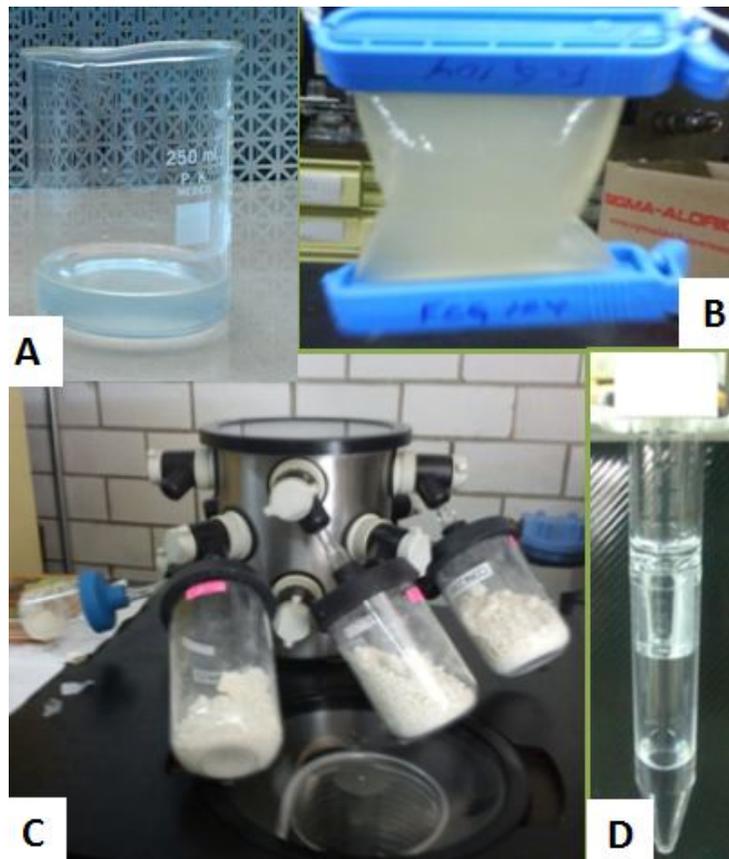
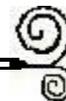


Figura 7. Obtención de moléculas menores a 10 KDa, A) Recolección del MC, B) diálisis por membrana de moléculas menores a 10 KDa, C) Liofilización de MC y D) exclusión molecular de moléculas menores a 10 KDa.

4) CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO.

4.1) Cuantificación de proteína.

Para la cuantificación de un posible compuesto de naturaleza peptídica se utilizaron dos métodos basados en la reacción de Biuret, en los cuales un complejo de Cu^{2+} reacciona con los residuos de los aminoácidos presentes en la muestra.



4.1.2) Método de Lowry.

En un tubo de ensaye se colocó 1 mL de solución C, que es una mezcla de una solución A Y B (solución A; Na_2CO_3 2%, NaOH 0.4 %, tartrato de sodio y potasio 0.16% y SDS 1%, solución B; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4%) en proporción 100:1, respectivamente. Posteriormente se agregó la cantidad de proteína deseada y se llevó a un volumen final de 1.35 mL con agua destilada. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 10 min, transcurrido este tiempo se agregaron 100 μL de reactivo de Follin, se agitó e incubó nuevamente a temperatura ambiente por 30 min para desarrollar color. La muestra fue leída en un espectrofotómetro, SHIMADZU UV-1601 adaptado a un CPS controller a una longitud de onda de 660 nm. El valor de la absorbancia se interpoló a una curva patrón que se realizó con una solución estándar de seroalbúmina de bovino (SIGMA) dentro de un intervalo de 0-100 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Anexo 3.1.1).

4.1.3) Método de ácido bicinconínico (BCA).

Para la preparación del reactivo de BCA se mezclaron 50 partes del reactivo A con una parte del reactivo B (Sigma Aldrich # B9643) hasta que se generó un ligero color verde. Una vez que se preparó el reactivo, éste se mezcló en una proporción 20:1 con la muestra.



En nuestro caso para preparar un 1 mL, se colocaron 950 μ L de reactivo BCA y 50 μ L de muestra, que en ocasiones fue diluida, debido a que la absorbancia excedía el rango de la curva de calibración (Anexo 3.1.2). Las muestras a las que se les midió proteína por el método de BCA fueron incubadas a 60° C durante 15 min en un baño de agua (Thermo Scientific Precision Series 280) posteriormente la muestra se leyó a 562 nm en el espectrofotómetro.

4.1.4) Método de ácido biciconínico (BCA) en placa.

Debido a que la cantidad de muestra era una limitante este ensayo fue realizado en placa de Elisa que consiste en colocar en posos de 300 μ L las muestras para determinar la proteína y medir con ayuda de un Equipo de ELISA. Para ello se realizó una nueva curva de calibración de 0.5 a 30 μ g (anexo3.1.3).

4.2) Separación del compuesto por medio del HPLC.

La separación de la fracción se realizó en un HPLC marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division , Kyoto, Japon) equipado con un detector UV-Visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP), un horno para columna CTO-10A, un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un sistema de



cómputo. El control del equipo, procesamiento y manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution LC solution.

El desarrollo del método analítico se llevó a cabo empleando diferentes columnas C18 (Tabla 4) con el fin de encontrar la más adecuada y que ayudará a resolver la mezcla de compuestos, además de diferentes mezclas de disolventes. La respuesta utilizada para evaluar la separación del compuesto fue la separación de los picos, así como la absorbancia (ABS) de los mismos.

Tabla 4. Tipos de columnas utilizadas en el análisis.

Columnas	Tipo	Tamaño de poro	Tamaño mm
HIBART	C18 RP	5 μm	150-4.6
FORTIS	C18 RP	5 μm	150-4.6
BRIDGE	C18 RP	5 μm	4.6-5.0
CROMOLITE	C18 RP	5 μm	3.0-4.6

Los disolventes para resolver la mezcla en el HPLC, fueron agua desionizada acidificada al 0.1% con ácido trifluoroacético (TFA), metanol (MeOH) grado HPLC, acetonitrilo (ACN) grado HPLC, todos con excepción de TFA, fueron filtrados en un matraz Kitasato (Millipore XX1504705) con una membrana de 0.45 μm . En la Tabla 5 se muestran la mezcla de los disolventes utilizados para la elución de la muestra con las diferentes columnas antes mencionadas.



Tabla 5. Mezcla de disolventes para resolver la mezcla de compuestos, fases; A) H₂O, B) ACN y C) MeOH.

Fase	Método	Flujo	Volumen de inyección
A 100%	Isocrático	1.00 mL/ min	50µL , 20 µL, 10 µL
A 100%	Isocrático	0.60 mL/ min	20 µL
b.A.100-70%			
b.B. 0-30 %	Gradiente	1.00 mL/ min	10 µL
b.C. 95-70%		1.00 mL/ min	
b.D. 5-30%	Gradiente		20 µL
A 99.5%			
B 0.5%	Isocrático	1.00 mL/ min	20 µL
A 98%			
B 2%	Isocrático	1.00 mL/ min	20 µL
A 95%			
B 5%	Isocrático	1.00 mL/ min	20 µL
A 90%			
B 10%	Isocrático	1.00 mL/ min	20 µL
A 95 %			
B 4 %	Isocrático	1.00 mL/ min	20 µL
C 1 %			
A 96%			
B 2%	Isocrático	1.00 mL/ min	20 µL
C 2%			
A 90%			
B 5%	Isocrático	1.00 mL/ min	20 µL
C 5%			



Nota: En las corridas se utilizaron algunos buffers, es el caso de b.A., b.B, b.C, y b.D (anexo 4.1).

Para poder comparar nuestro compuesto con una referencia se adquirió un estándar para HPLC que contiene una mezcla de péptidos de bajo peso molecular (No H2016) y cuya composición se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición estándar Sigma Aldrich No H2016.

	Aminoácidos	Peso molecular
G 3502	Gly-Tyr	238.2
V 8376	Val-Tyr-Val	379.5
M 6638	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	573.7
L 9133	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	555.6
A 9525	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	1046.2

Nota: El cromatograma del estándar se muestra en el anexo 4.2.

4.3) Preparación de la muestra para RMN ¹H.

Para llevar la muestra a RMN ¹H fue necesario medir proteína, por el método de BCA, a la muestra de peso molecular menor a 10 KDa. Una vez que se conoció la cantidad de péptido presente en la muestra se colocó el volumen en el que se encontraban 3 mg de péptido en un eppendorf. Éste se congelo con N₂ líquido para posteriormente ser colocado en la liofilizadora. Una vez que la muestra se llevó a sequedad la muestra fue leída en el Laboratorio 3 del Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM.



4.3.1) Determinación de carbohidratos.

En un tubo de ensayo se colocó 0.1 mL muestra menor a 10 KDa, 0.3 mL de solución de fenol al 5%, finalmente, 1.8 mL de H₂SO₄, éste último fue agregado rápidamente, pues la reacción es muy exotérmica. La muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente para que desarrollara color, una vez que se enfrió se leyó a 485 nm en un espectrofotómetro y la cantidad de carbohidratos presente en la muestra se calculó de acuerdo a la curva patrón de glucosa (anexo 5.1).

4.3.2) Columna de intercambio iónico.

Una muestra llevada a sequedad con ayuda de la liofilizadora, se diluyó en 1 mL de buffer 20 mM de acetato de amonio (pH7.5) y se cargó en columna (QIAGEN Disposable No 1018598) de que contenía 1.5 x 0.5 cm de DEAE Sephadex A- 25 la cual fue equilibrada con 20 mM de acetato de amonio (pH= 7.5). La muestra se eluyó con alícuotas de 2 mL de buffers 200 mM, 400 mM y 600 mM, cada fracción fue colectada y a todas se les cuantificó carbohidratos y proteína.

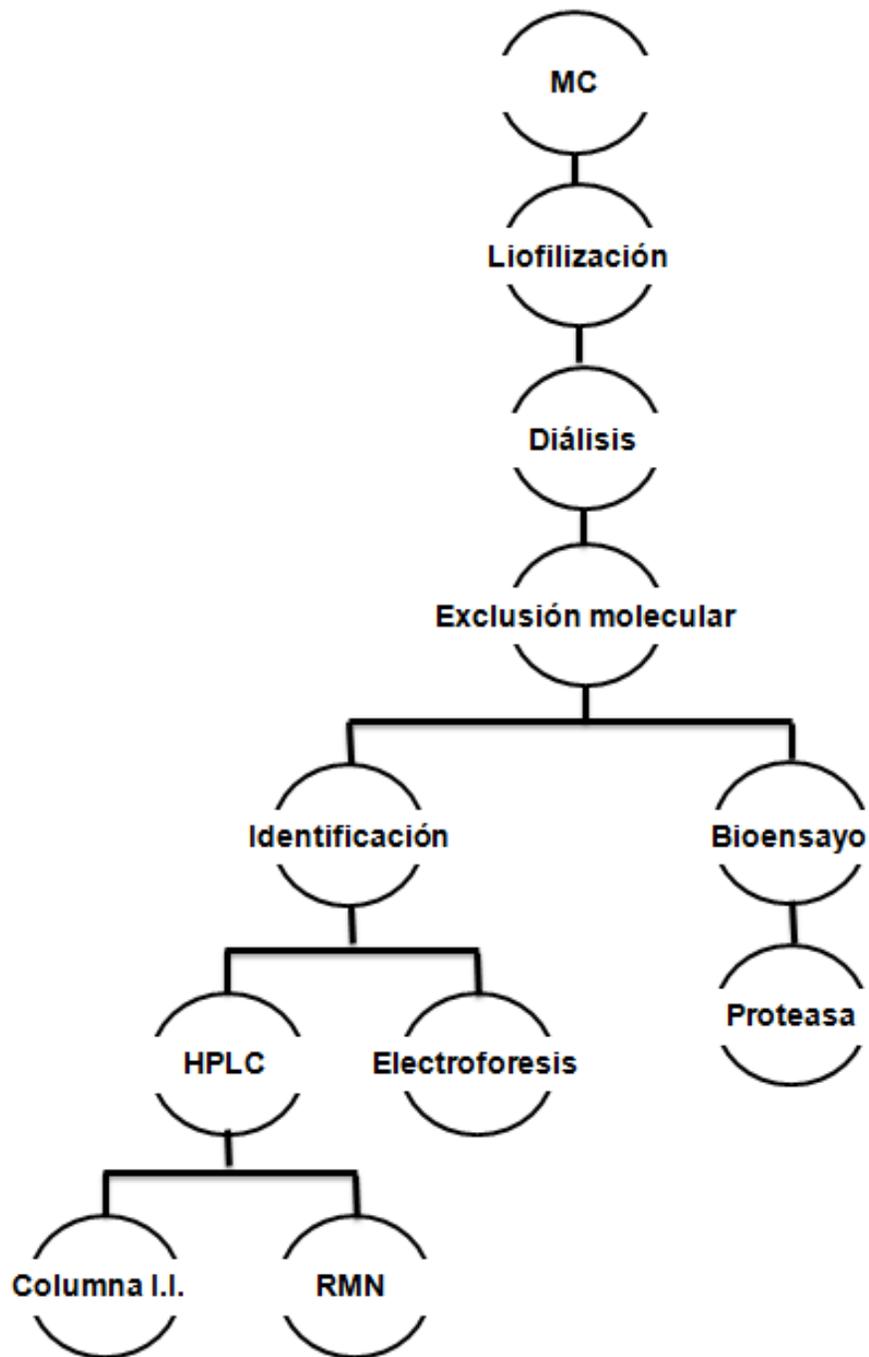


Figura 8 Diagrama de la estrategia usada para la obtención del factor de crecimiento a partir de MC.



5) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PÉPTIDO MEDIANTE BIOENSAYO.

Con el fin de conocer la actividad mitogénica del factor en las células de Bt se realizaron diferentes bioensayos, de los cuales debido al gran número de muestras que había que manejar se decidió utilizar una sola concentración de MC. Para realizar la evaluación del mismo, se tuvieron en consideración varios factores tanto para las CS como el MC.

Para las CS

- 🌿 Las CS sobre las que se evaluó el comportamiento del factor fueron de una de las líneas celulares que presentaba alta proliferación celular en suspensión, 3Bt. Además de ser células jóvenes, es decir; células cuya inoculación para formar CS ocurrió 18 días antes de comenzar el bioensayo (14 corresponden a la metodología establecida para la inducción a suspensión y tres más para que las células finas se aclimaten en el medio).



Para el MC

- El factor de crecimiento semi purificado proviene de MC de Bt de células jóvenes, que a diferencia del MC de células de mantenimiento (cuyo periodo después de la inducción a CS es de hasta 3 meses y el cual se ha colectó cada 10 días) no alcanza a formar agregados celulares debido al poco tiempo entre su uso y la inducción de CS. El MC que se utilizó fue liofilizado, dializado y se purificó mediante ultrafiltración para colectar la fracción con masa molecular menor a 10 KDa.
- Nos referimos a un medio 2X debido a que la concentración de las sales del medio MS es el doble, a este medio también se le agregaron $25 \text{ ul}\cdot\text{L}^{-1}$ de cefotaxima.

Otras consideraciones

- Con las curvas de crecimiento anteriores se conocen dos concentraciones a las cuales la proliferación es alta y baja, estas nos sirvieron para delimitar un límite superior y uno inferior sobre los cuales se evaluó el factor. Estas también ayudaron a conocer el punto de inflexión en el que la velocidad de crecimiento aumentó considerablemente (pendiente), por lo que, la evaluación del bioensayo se llevó a cabo en este punto.

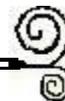


- En todo momento del seguimiento del bioensayo se tuvo un control, el cual nos sirvió como referencia en la medición de la proliferación celular.

5.1) Bioensayo.

Como se ha descrito en la literatura (Matsubayashi, 1996) se utilizó un bioensayo que contenga un 50% de MC en CS y 50% de medio MS 2X. Para ello, se utilizó la metodología desarrollada en las curvas de crecimiento celular, con algunas diferencias significativas.

En condiciones de asepsia, en matraces de 50 mL se colocaron 2.5 mL de MC 2X, a este volumen se le agregaron los mL necesarios para que la densidad celular final fuera de 1.0, 0.50 y 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CS y se completa a 5 mL con medio MS 2X conteniendo antibiótico. Por ejemplo, si tenemos una suspensión celular de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, para una muestra de 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ se tomaron 0.5 mL de CS, a este volumen se le agregaron 2 mL de medio MS 2X, finalmente, 2.5 mL de MC 2X. Estos matraces se taparon con papel aluminio para posteriormente ser colocados en condiciones de incubación. Cada punto del bioensayo se llevó a cabo por triplicado, y se monitoreó cada 7 días. El contenido de cada matraz se filtró, se pesó y finalmente se obtuvo la densidad.



5.2) Bioensayo con el MC después del tratamiento con proteasa.

Para este bioensayo, se utilizó la proteasa (Sigma Aldrich No 232-752-2), se preparó un buffer de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ 20 mM (pH=7.5) a una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se liofilizaron 2.5 mL de MC con moléculas menores a 10 KDa, para disolverlo en 1.9 mL de buffer y se agregó 0.1 mL de la solución de proteasa, posteriormente, se incubó a 37°C durante 3 hs. la enzima se inactivó a 100°C durante 10 min. Una vez que se preparó la muestra de MC con proteasa, se colocó un pequeño bioensayo agregando esta solución en lugar de MC habitual. Las muestras que se prepararon fueron de 0.1, 0.5 y $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ final con un único punto a medir, que corresponde a los 24 días.



VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) Mantenimiento de los cultivos de Bt.

El callo *Bt* (Figura 9A) presentó poca oxidación, por lo cual el subcultivo en medio sólido se realizó aproximadamente cada 30 días de cultivo MS. Mientras que a las CS se mantenían agregando medio de cultivo fresco, cada 10 días para evitar su oxidación.

1.2) Obtención de microcallos para líneas celulares.

Como ya se mencionó, después de un mes de iniciado el cultivo en suspensión a partir de callo *Bt*, se observó la formación de pequeños agregados celulares, microcallos (Figura 9C; Figura 10) los cuales fueron transferidos a medio sólido MS (Figura 9D).

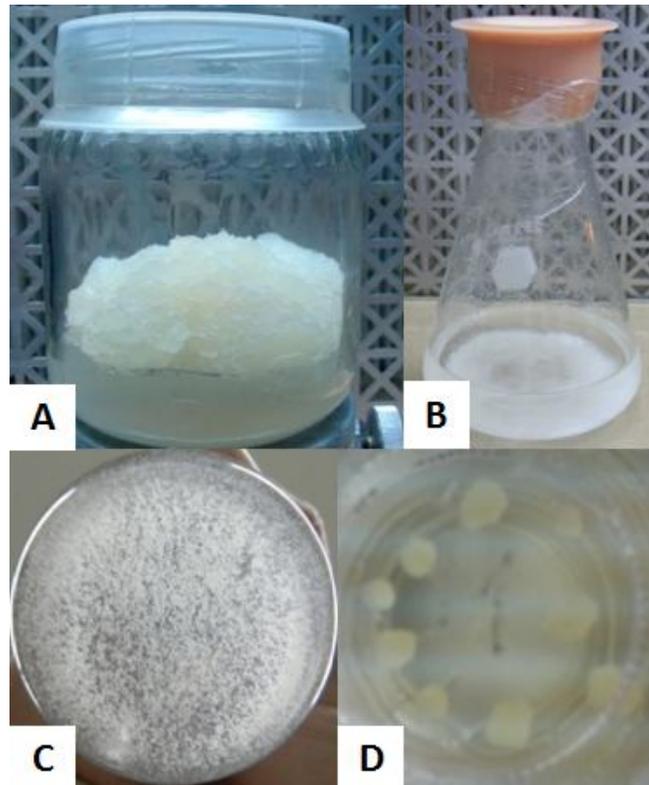


Figura 9. Obtención de líneas celulares; A) callo Bt en medio MS sólido, B) CS proveniente de callo Bt, C) formación de microcallos en medio MS líquido D) microcallos en medio MS.

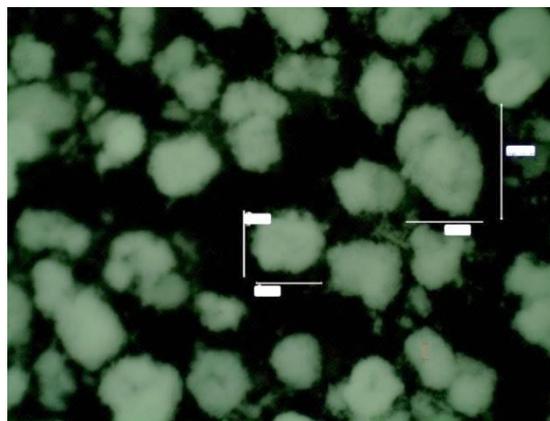
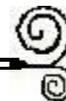


Figura 10. Fotografía de los microcallos en suspensión vistos con microscopio estereoscópico objetivo 40X, tamaño real del agregado 6 μm (micrometros).



1.3) PROPAGACIÓN DE MICROCALLOS EN MEDIO SÓLIDO

Durante el desarrollo de los microcallos se les dio seguimiento con ayuda del microscopio estereoscópico durante 150 días a cada una de las líneas celulares, considerando como un parámetro el diámetro del callo, con el cual se observó indirectamente la velocidad de crecimiento en las líneas celulares. Los datos indican que el crecimiento de las líneas presentó el orden siguiente: 1Bt mayor a 2 Bt mayor a 3 Bt (Figura 11). Además, todas las líneas presentaron características como friabilidad y coloración blanquizca.

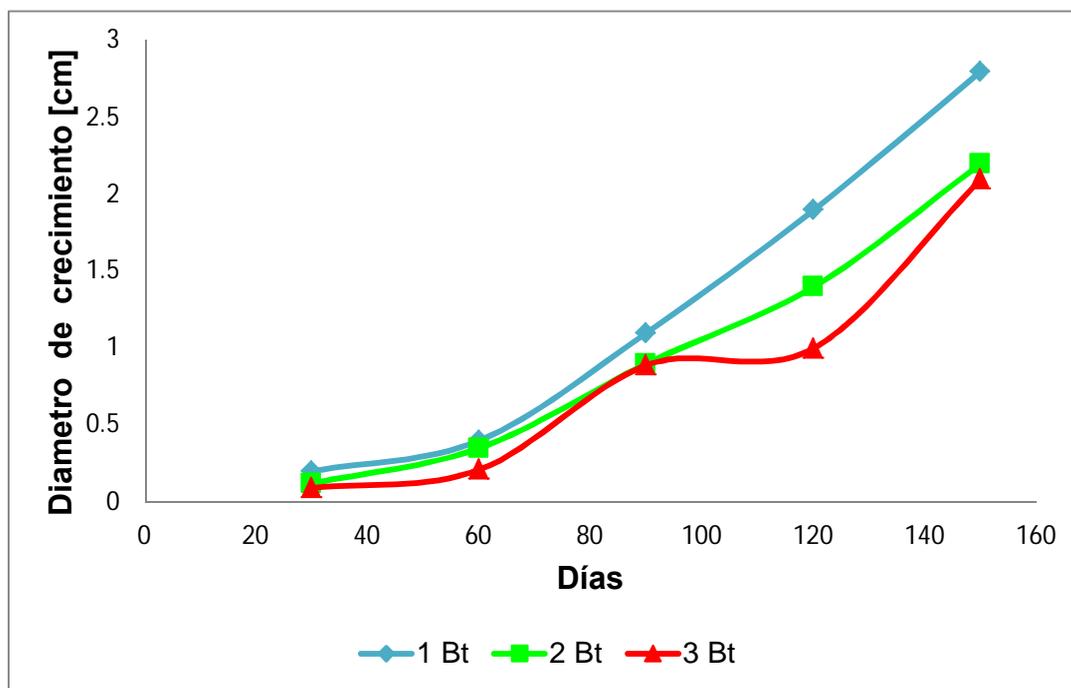


Figura 11. Gráfica de crecimiento de los microcallos de las líneas celulares de *Bt* durante 150 días a partir de su pase a medio sólido MS.



Como ya se mencionó se les dio seguimiento a las líneas celulares por medio de fotografías, en la Figura 12 se muestran el caso particular de la línea 3Bt.

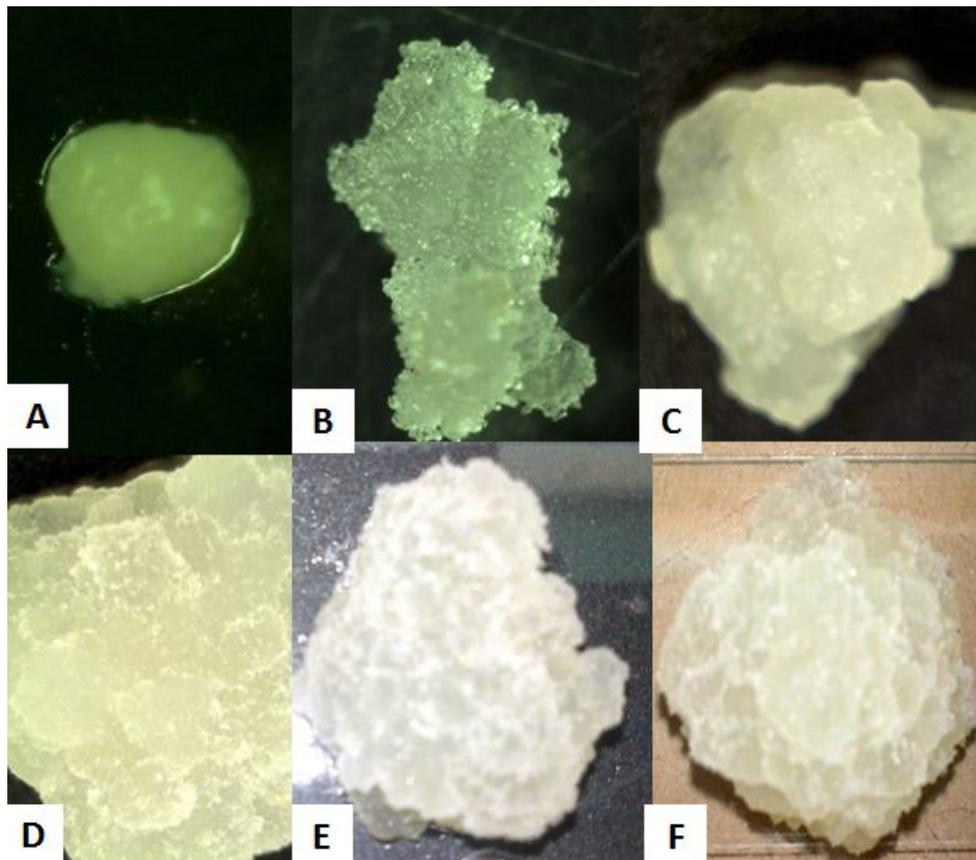


Figura 12. Desarrollo de microcallo 3Bt, A) 1 día pase a medio sólido, 0.05 cm de diámetro; B) 30 días de crecimiento, 0.09 cm de diámetro; C) 60 días de crecimiento 0.21 cm de diámetro; D) 90 días de crecimiento 0.89cm de diámetro. El objetivo utilizado en el microscopio estereoscópico fue diferente en cada caso: A se observó con un objetivo de 40 X; B con un objetivo de 30 X. Mientras que C y D se observaron con objetivo 10 X. E) a los 120 días de crecimiento 1.0 cm de diámetro y F) a los 150 días de crecimiento 2.1 cm de diámetro, cámara fotográfica.



Los callos de cada línea celular se proliferaron durante seis meses, trasvasándose cada 30 días. Durante ese tiempo se generó el material suficiente para iniciar los cultivos en suspensión de las diferentes líneas celulares (Figura 13).

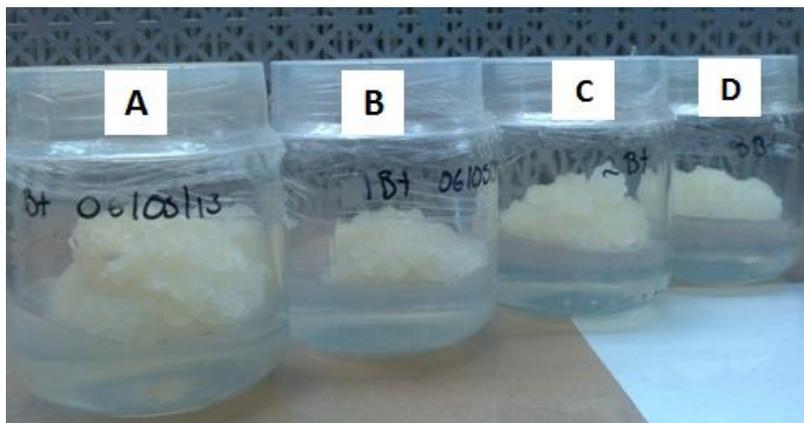


Figura 13. Líneas celulares y callo heterogéneo, de izquierda a derecha, Bt, 1Bt, 2Bt y 3Bt, en todas ellas se observa nula oxidación del callo por lo que su coloración es blanquizca.

1.4) Establecimiento de cultivos en suspensión de las líneas celulares.

Para conocer las características de cada una de las líneas celulares se indujeron CS de los tres cultivos. Debido a los recursos que representaba conocer todas las curvas de crecimiento se eligió la línea celular, que en 10 días de cultivo presentaba el mayor aumento de densidad celular.

Como se observa en la Figura 14, de las líneas celulares 3Bt fue la de mayor densidad celular, sin embargo, en la misma figura muestra



que el cultivo heterogéneo, Bt, presentó la máxima densidad de todos los cultivos líquidos estudiados.

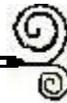


Figura 14. Apariencia del CS durante 10 días de crecimiento callo heterogéneo y líneas celulares; A) Bt, B) 1Bt, C) 2Bt y D) 3Bt.

1.5) Curvas de crecimiento de CS a diferentes inoculo iniciales de la línea 3 Bt.

Se ha reportado que para que las células en suspensión crezcan en especies como espárrago se requiere de un inoculo inicial de por lo menos 1×10^5 células (Matsubayashi, 1996), en nuestro caso, no se realizó el conteo de células mediante la cámara de Neubauer. Para definir el inoculo mínimo que permitiera el crecimiento del cultivo se realizaron curvas de crecimiento con diferentes densidades celulares, mediadas a través de peso fresco mg mL^{-1} .

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 15 en donde se observa que a medida que disminuye el inoculo celular,



de 6 a 3 mg peso fresco (PF) de células·mL⁻¹, la fase lag se incrementa, así como el valor de la pendiente de la fase log, la cual fue calculada tomando en cuenta el punto de inflexión posterior de la fase lag y el valor del punto a los 21 días, Tabla 7.

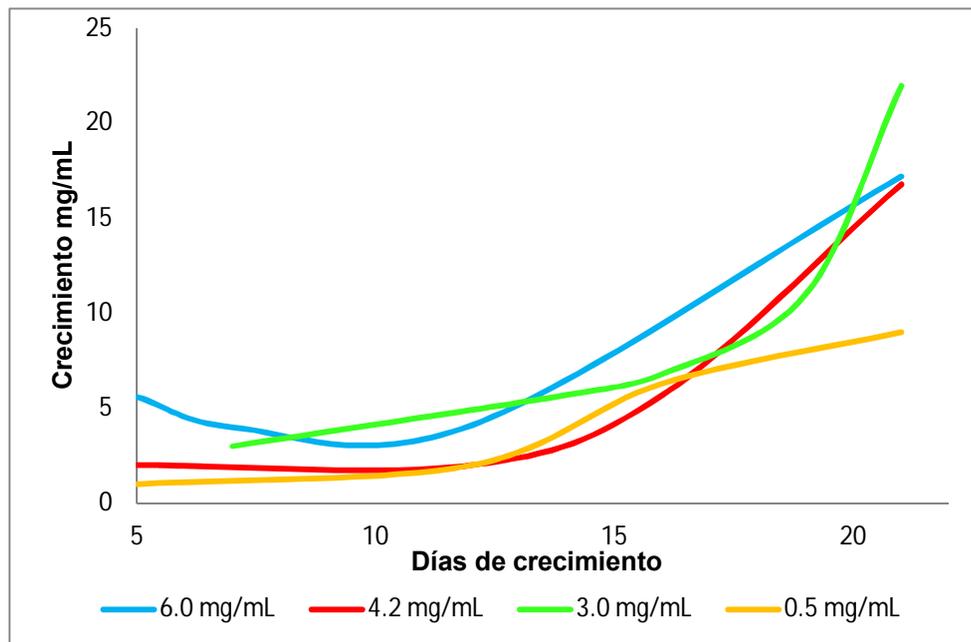


Figura 15. Curvas de crecimiento de células en suspensión 3Bt iniciadas con diferente densidad celular. En ellas se observa la fase de adaptación de las células, así como el inicio de la fase log.

El comportamiento antes descrito contrasta con la curva de crecimiento resultante de un inóculo de 0.5 mg·mL⁻¹, dado que en esta gráfica, Figura 15, se observan dos puntos de inflexión, y una pendiente muy pequeña entre ellos.

Tabla 7. Características de la velocidad de crecimiento de CS a diferentes densidades iniciales para la línea 3Bt.



Densidad inicial	Pendiente en fase log	Inicio fase log
6.0 mg / mL	1.45	Día 10
4.2 mg / mL	2.22	Día 11
3.0 mg / mL	5.5	Día 18
0.05 mg / mL	0.93	Día 13

1.6) Cinética de crecimiento de la línea 3Bt partiendo de dos densidades celulares iniciales diferentes.

En base a los datos de la Tabla 7 se eligieron dos densidades celulares, la de mayor pendiente, $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, y menor pendiente, $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, las cuales representarían un límite superior e inferior. De esta manera se conoció el comportamiento de las curvas de crecimiento, así como las densidades aproximadas en las que se podría evaluar un bioensayo.

Los resultados fueron graficados en la Figura 16, para la densidad celular de $3.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, la curva de crecimiento fue monitoreada durante 40 días. A partir del día 15 se observó que la densidad celular incrementó considerablemente hasta obtener una suspensión densa, que a pesar de la alta densidad presento poca o nula oxidación.

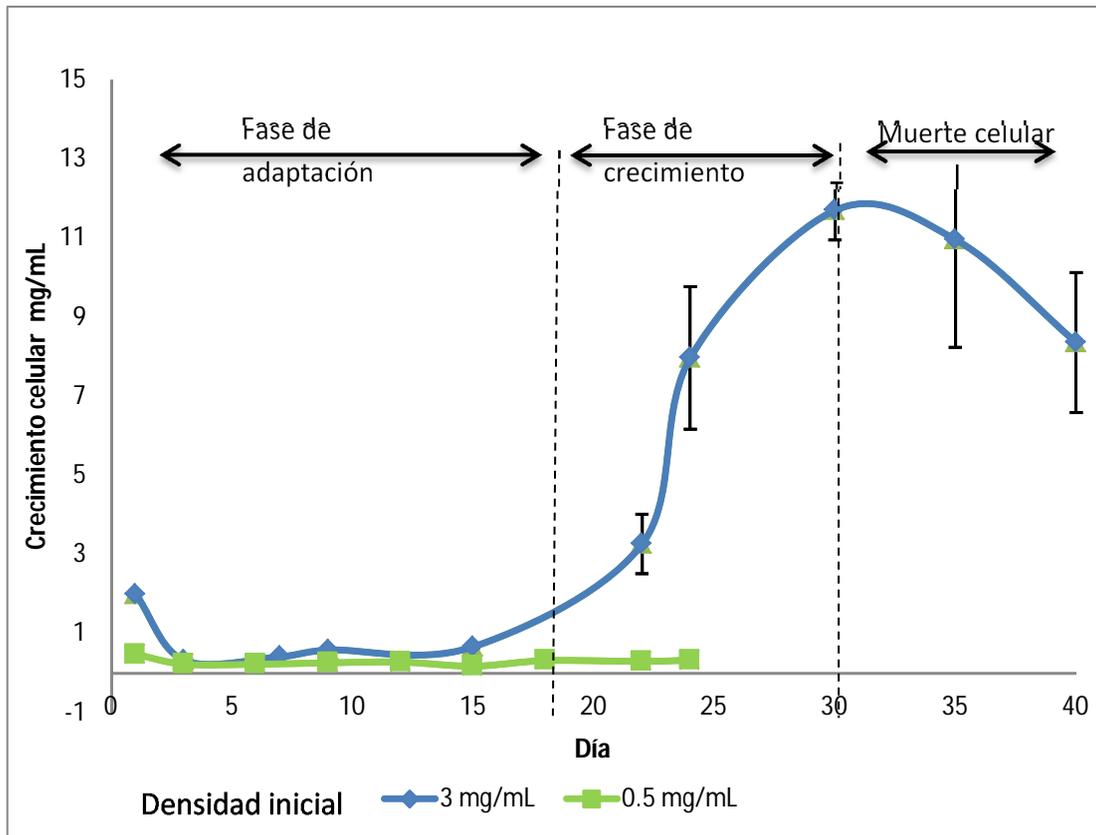


Figura 16. Curva de crecimiento del cultivo en suspensión de la línea celular 3Bt. En el cultivo iniciado con 3 PF $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en la gráfica se señalan las diferentes fases de crecimiento, aunque la fase estacionaria no se detecta claramente.

En la gráfica de la Figura 16 se observa que para la densidad de 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ se tiene un incremento significativo de biomasa entre el día 22 y 24, en contraste el cultivo de densidad celular de 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, el incremento fue muy poco casi nulo, por lo que el seguimiento sólo se realizó por 21 días. También se observa que en los últimos puntos de la curva 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ tienen una desviación estándar mayor a los primeros, sin embargo, aún cuando sean mayores se observa

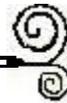


que la gráfica describe un crecimiento exponencial. Tomando en cuenta los resultados de la Figura 16 se estableció que el límite inferior de densidad celular a la que las células ya no crecen de manera significativa es de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

1.6) Morfología y viabilidad de las células en suspensión.

La viabilidad de las células se realizó con el fin de saber si las células en suspensión con las cuales se realizaron los experimentos, tales como las curvas de crecimiento y el bioensayo eran viables y en qué porcentaje, además de conocer la morfología mediante una técnica colorimétrica. Ambas técnicas se realizaron con células de 5 días posteriores a la segunda transferencia, después de iniciado su cultivo en medio líquido, por lo cual son células jóvenes.

El azul de tripán es un colorante azoico que al estar cargado positivamente interacciona con los ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos (cargados negativamente), por lo cual la única manera de que interaccionen es cuando la células se encuentra no viables (Sigma Aldrich No catalogo T8154) . Si bien no nos permite conocer la viabilidad celular, sí es posible conocer la morfología, que en el caso muy particular de 3 Bt presento formas esféricas, arriñonadas y ovaladas, formando pequeños cúmulos (Figura 17 A).



La viabilidad de las CS se obtuvo tiñendo las células con diacetato de fluoresceína. Éste es un colorante permeable que al ser excitado a 40 nm emite una coloración verde (Benítez, 2009). Para calcular la viabilidad se tomaron dos fotografías del mismo espacio microscópico, una en campo fluorescente, donde se observaron las células vivas, coloreadas de verde, la otra se tomó en campo claro. Las células totales en el campo claro fueron 46 (Figura 17 B) de las cuales solo 40 (Figura 17 C) aparecen en el campo fluorescente, indicando que están viables, representando un 87%.

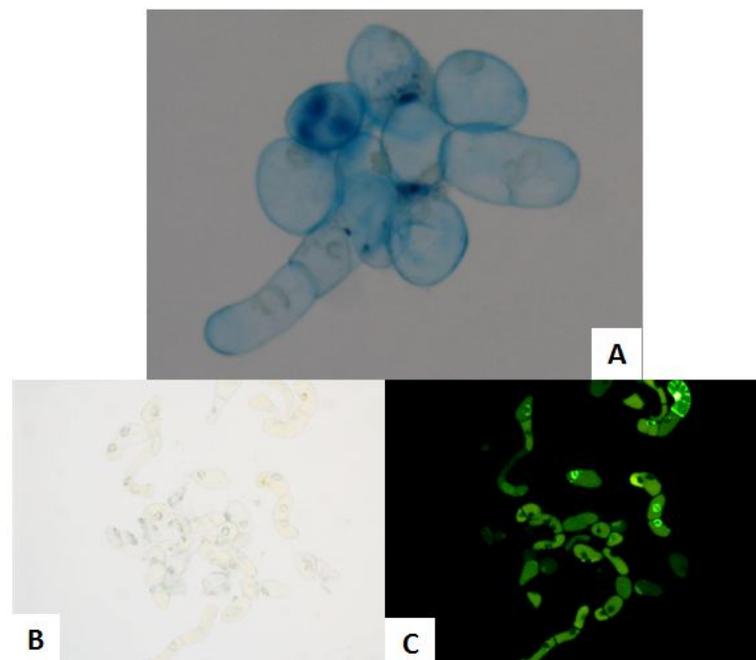


Figura 17. Viabilidad celular de cultivos en suspensión de la línea celular 3 Bt. A) Tinción con azul de tripán de células jóvenes 3Bt, B) campo claro y C) tinción con fluoresceína. Las células teñidas de 18 días a partir de su inoculación.



2) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL MEDIO CONDICIONADO.

Las células vegetales en cultivos de baja densidad usualmente exhiben baja actividad mitogénica, la cual es mejorada por la suplementación con hormonas de plantas o nutrientes definidos. Sin embargo la proliferación celular también es inducida por la adición de MC preparado de cultivos celulares de rápido crecimiento. La explicación de este fenómeno es la secreción de un factor mitogénico producido por células individuales dentro del MC, varios autores han probado la actividad del MC en especies como *Panax notoginseng* y *Taxus chinensis*, (Wang, 2002; Woragidbumrung, 2001; Yao, 1999), nuestro bioensayo se realizó de igual manera colocando un volumen de MC del 50% (v/v) y otro 50% (v/v) de medio MS.

Para evaluar el efecto del MC en el crecimiento celular se colocaron diferentes densidades celulares iniciales, las células sobre las cuales se evaluó el efecto del MC fueron CS de la línea 3 Bt; el medio de cultivo condicionado provenía de células heterogéneas de Bt en suspensión cuyo MC se obtuvo a lo largo del mantenimiento de cultivo celular durante aproximadamente 4 meses. El efecto del MC en la proliferación celular se midió en base al peso seco de las muestras, pues éste es un parámetro que permite cuantificar el aumento de masa sin considerar el agua que pueda absorber la



vacuola celular. Como control se utilizó el mismo bioensayo sin adicionar MC. Las lecturas se realizaron a los 22 días de iniciado el cultivo, porque fue el período en el cual se estableció la fase logarítmica de la curva de crecimiento de células de la línea 3Bt (Figura 18).

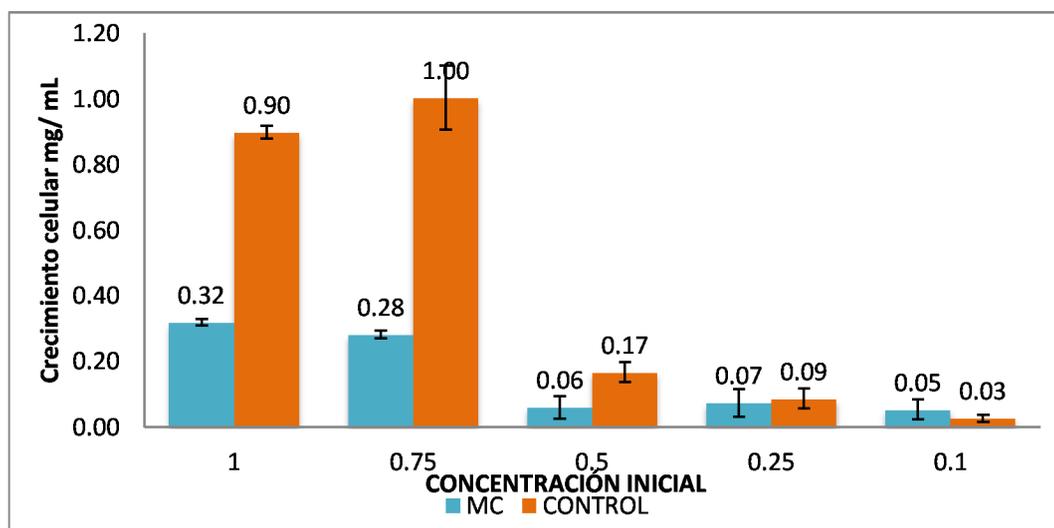


Figura 18. Efecto del MC sobre el crecimiento celular. Diferentes densidades celulares se incubaron en presencia (50% v/v) y ausencia de MC.

Realizando una prueba *t de student* a los resultados obtenidos para comparar los métodos se calculó la *t* para las muestras a las que se les había agregado MC con respecto al valor calculado para el control, 0.43 y 0.15 respectivamente, lo que indica que efectivamente hay una diferencia en el comportamiento de ambos métodos; sin embargo, no era el que se esperaba. Este experimento (Figura 18) indicó que la adición de MC inhibió el



crecimiento de los cultivos con excepción del cultivo iniciado con una densidad de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Dado que este resultado no era el esperado, el bioensayo se repitió utilizando células de cultivo en suspensión recién establecidas (18 días desde que se inició CS) y sólo se estudiaron tres densidades celulares (Figura 19). El experimento se realizó por triplicado y el peso seco se determinó a diferentes períodos. En esta ocasión no sólo se evaluaría el efecto, si no el tiempo y la interacción entre ellos.

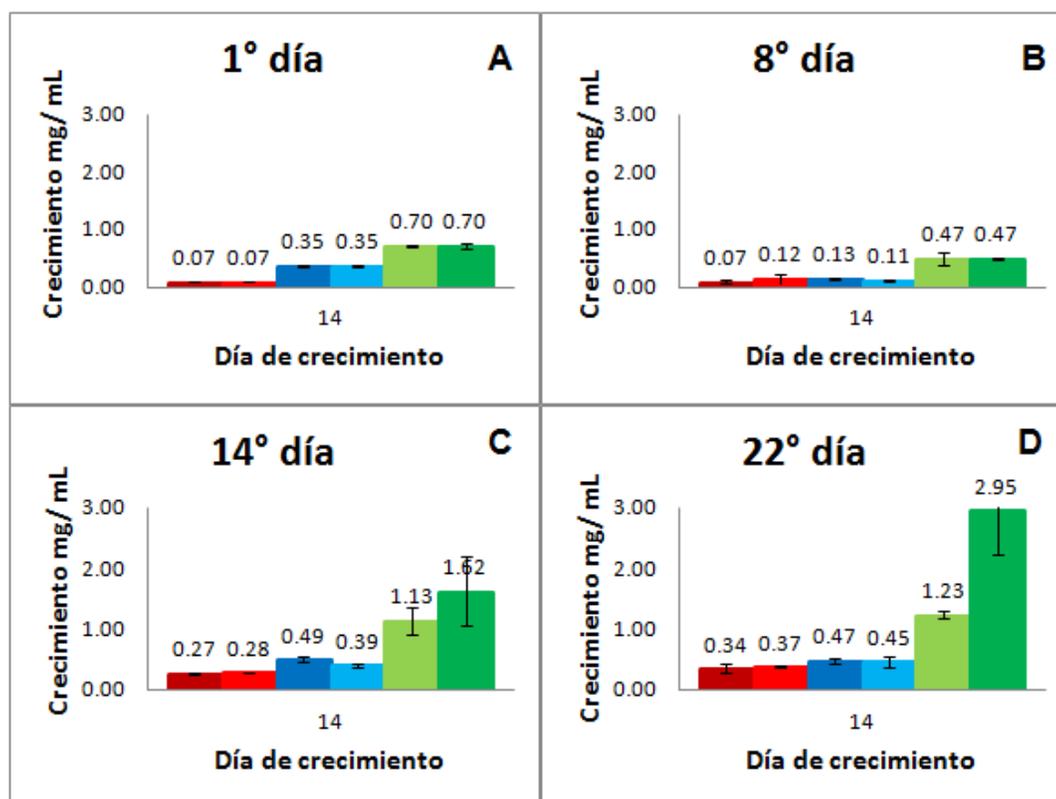
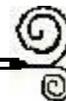


Figura 19. Efecto del medio condicionado sobre el crecimiento de células jóvenes 3Bt. Densidad celular PF $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ■ 0.1C ■ 0.1MC ■ 0.5C ■ 0.5MC ■ 1C ■ 1MC



Como se puede observar en los p neles de la Figura 19, la adici3n de MC s3lo increment3 la proliferaci3n celular, a partir de los 14 días en los cultivos iniciados con una densidad celular de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $1.0 \text{ PF mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. El incremento a los 14 días de crecimiento fue del 61 %, mientras que a los 22 días fue del 236 %. Para saber si hay diferencias significativas en el experimento graficado en la Figura 19 se realizando una ANOVA en la cual la hip3tesis nula supone que H_0 la igualdad entre las densidades iniciales, así como la igualdad en su comportamiento respecto al tiempo. Los datos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Anova para densidades y tiempo.

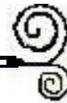
Causa de variaci3n	gl	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados
Entre densidades	5	4.90	0.98
Entre tiempo	3	1.98	0.66
Error	15	2.47	0.164
	23	9.35	

Los test de significaci3n indican:

Entre densidades: $F=0.98/0.164= 5.97$

Entre el tiempo: $F=0.66/0.164= 4.02$

De acuerdo a la tabla de distribuci3n F, el cuadrado de las medias entre densidades tiene 5 grados de libertad (gl) y el cuadrado de las medias para el error tiene 15 gl, por lo tanto el valor, de $F_{0.05} =$



2.90, si el valor calculado para $F=5.97$, por lo que el valor calculado para F excede al crítico, H_0 se rechaza, es decir hay una variación entre densidades. A los datos se le realizó la prueba de Tukey.

Tabla 9 Prueba de Tukey para los diferentes tiempos

	1	8	14	22
1	-	0.145	0.696	0.968
8	-	-	0.468	0.740
14	-	-	-	0.271
22	-	-	-	-

Calculando la diferencia significativa honesta de Tukey (DSH) se obtiene un valor de 1.464, por lo tanto todas son significativas, en la Figura 20 se observa la prueba de Tukey en una gráfica.

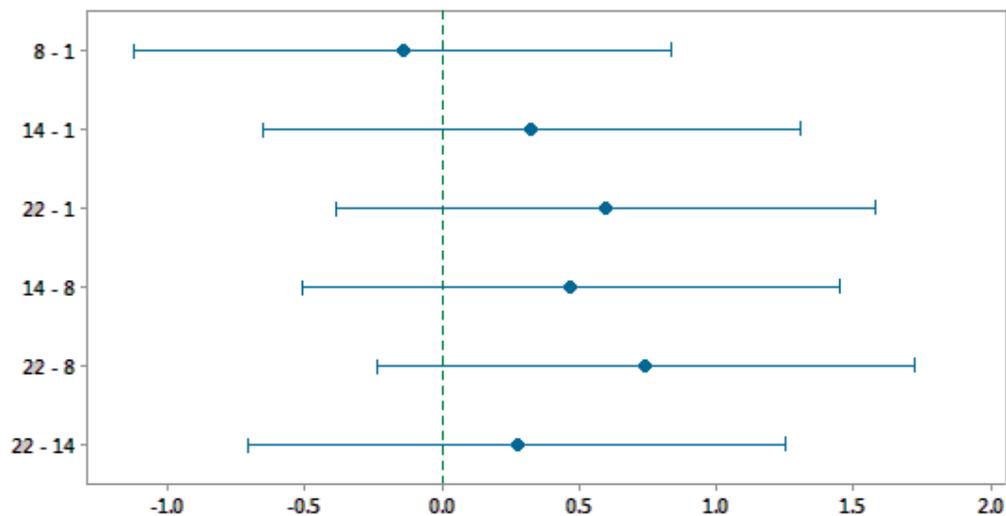


Figura 20. Intervalos de confianza para Tukey al 95%, diferencia entre los días 1, 8, 14 y 22, si un intervalo contiene cero las medidas correspondientes son significativamente diferentes.



De igual manera se sigue el mismo razonamiento para estudiar los valores en el tiempo, $F_{0.05} = 3.29$ contra $F=4.02$, este valor excede al valor crítico por lo se puede decir que hay una diferencia significativa. A los datos se le realizó la prueba de Tukey.

Tabla 10. Prueba de Tukey para las diferentes densidades.

	0.1C	0.5C	1.0 C
0.1 MC	0.022	-	-
0.5 MC	-	0.035	-
1.0 MC	-	-	0.552

Calculando la diferencia significativa honesta de Tukey (DSH) se obtiene un valor de 1.34, la comparación para este caso se realizó no sólo respecto a las densidades, sino también a la adición de MC. De acuerdo a los valores si hay diferencia.

Los resultados de la Figura 19 también se graficaron como líneas continuas (Figura 21) donde se observa que el período de adaptación del cultivo fue similar para todas las densidades celulares utilizadas en el experimento, 8 días, con lo cual se eliminó la hipótesis planteada al principio del trabajo, la cual daba la posibilidad de que el tiempo de adaptación en presencia del MC pudiera reducirse y que, de esta manera, la proliferación celular iniciara antes.

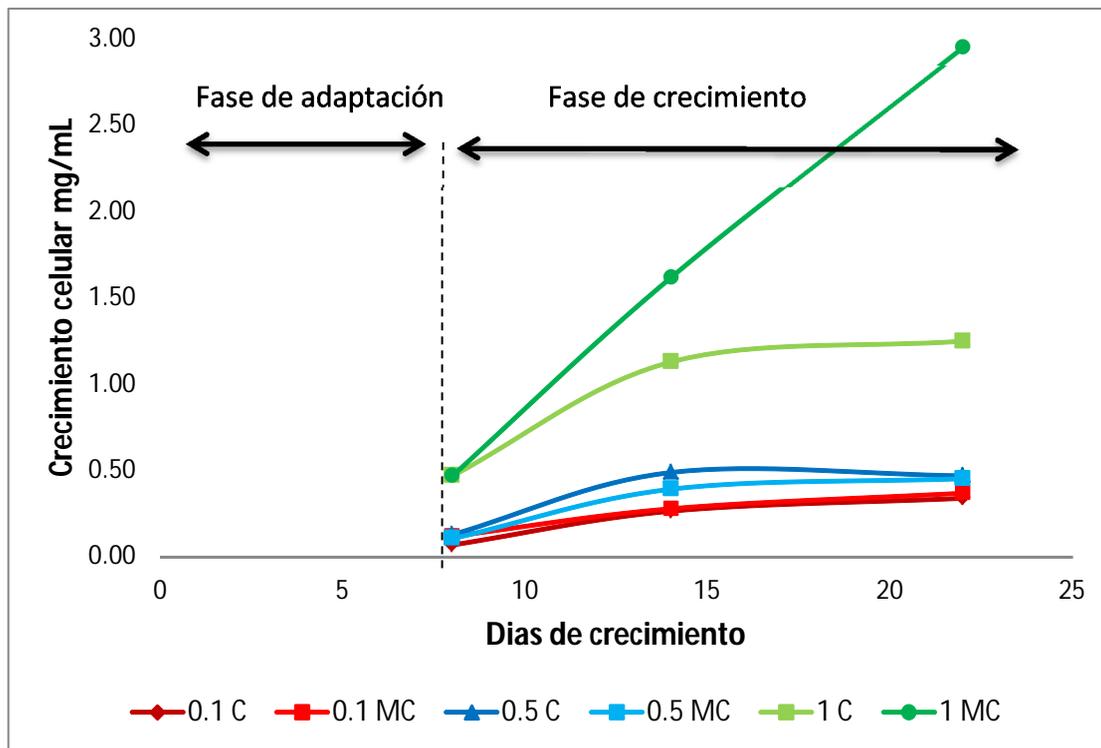


Figura 21. Cinética del efecto del medio condicionado en el crecimiento de cultivos en suspensión iniciados con diversas densidades celulares.

Finalmente, para saber si el factor de crecimiento era de naturaleza peptídica se realizó un experimento en el cual se le adicionó proteasa al MC semipurificado, la actividad de la proteasa se inhibió por calentamiento. Posteriormente, se realizó el bioensayo utilizando células en suspensión sin MC, con MC y con MC tratado con proteasa (MCP).

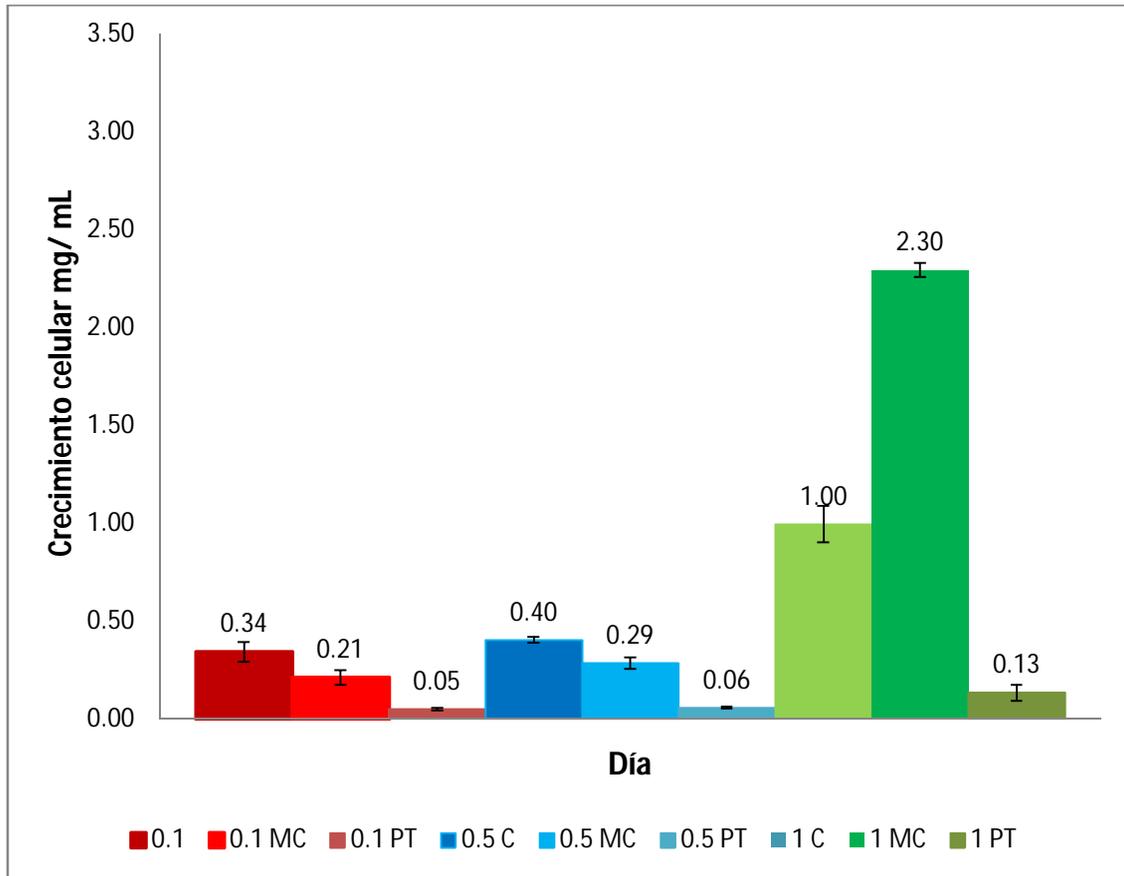


Figura 22 El efecto de la proteasa en el MC adicionado a las CS de 3Bt. Las siglas C (control), MC (medio condicionado) y PT (proteasa).

Para saber si existe diferencia entre los 3 tratamientos se realizó una prueba ANOVA, los datos se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11 Anova para los 3 tratamientos de las células en suspensión.

Causa de variación	gl	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados
Entre tratamientos	2	1.10	0.551
Error	6	3.07	0.512
	8	4.17	



El test de significación indica:

Entre tratamientos: $F=0.551/0.512= 1.07$

Si el valor de $F_{0.05} = 5.14$, si el valor calculado para $F=1.07$, F no excede al crítico, por lo H_0 no se rechaza, es decir no hay variación entre tratamientos.

En la Figura 22 se observa que la adición de MC a los cultivos con densidades celulares menores de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibe el crecimiento celular, mientras que en el cultivo iniciado con $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, la adición de medio condicionado incrementó la proliferación celular. Sin embargo, en todos los casos el efecto de adicionar medio condicionado proteolizado inhibe el crecimiento celular ya que la densidad celular del cultivo al terminar este tratamiento es mucho menor que la del cultivo sin adición de medio condicionado. El resultado anterior se podría explicar proponiendo que el tratamiento para inactivar la proteasa no fue adecuado o bien que en el medio condicionado se encuentran dos factores, uno de naturaleza peptídica que incrementa la proliferación y otro de naturaleza no protéica que inhibe el crecimiento.

3) CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL FACTOR.

Al mismo tiempo que se demostraba que había un factor presente en el MC que inducía el crecimiento celular, se inició la identificación



del posible factor de crecimiento. Esta última parte del trabajo no se pudo concluir, sin embargo se muestran los resultados obtenidos de la semi purificación del mismo.

Anteriormente se ha reportado que en plantas superiores, la interacción célula a célula es principalmente mediada por compuestos pequeños lipófilicos (llamadas hormonas de plantas) como auxinas, citoquinas, giberilinas, ácido absicico, etileno, brasinosteroides y jasmonatos, esos compuestos median la comunicación célula a célula en muchos estados de desarrollo sin embargo no son de naturaleza peptídica (Matsubayashi, 2006). No obstante estudios bioquímicos y genéticos indican que algunos compuestos de naturaleza peptídica están involucrados en varios aspectos de la regulación del crecimiento de las plantas y señalización. Estos compuestos presentan diferentes funciones; CLAVATA3, regularización de meristemas apicales de raíz; Polaris, crecimiento de raíz, SCPR/SP11 compatibilidad; PSK iniciación de la proliferación celular y la diferenciación de tejidos maduro, por mencionar algunos (Farrokhi, 2008). De ahí la idea de que se trataba de un compuesto peptídico, similar a PSK, por lo que se procedió a la implementación de técnicas para cuantificación y purificación de proteínas.

En la Tabla 12 se muestran volúmenes de MC antes y después de la liofilización. Para saber el contenido de material, posiblemente peptídico, presente en el MC concentrado se cuantificó la cantidad



de péptidos mediante métodos colorimétricos clásicos utilizados para cuantificar proteínas, Lowry y BCA.

El método de BCA resultó más útil que el de Lowry, a pesar de que en ambos casos se desarrolla color debido a la reacción de Biuret, la cual desarrolla un color azul-morado en presencia de complejos de Cu (Douglas). El contenido de péptido en las diferentes fracciones de MC concentrado fue de 0.14-0.44 mg·mL⁻¹.

Tabla 12. Volumen de MC colectado y liofilizado para la extracción de los péptidos de Bt.

Volumen inicial MC	Volumen MC después de liofilizar	mg totales de péptidos <10 000 MW
240 mL	73 mL	14
208 mL	27 mL	12
236 mL	30 mL	12

3.2) Separación del compuesto mediante HPLC.

En los primeros intentos por conocer algunas de las características de nuestro posible factor de crecimiento, realizamos algunas pruebas que no resultaron adecuadas, tales como un gel de tris-tricina al 16%. Dado que esta prueba fue fallida se optó por utilizar otros métodos analíticos de mayor resolución y los cuales se han utilizado en la determinación de otros péptidos (Sagar, 2012) incluso de PSK (Matsubashi, 1996). Como se ha descrito en la literatura el



uso del HPLC es de gran utilidad en la separación de biomoléculas (Carr, 2002), con el fin de resolver la mezcla de compuestos en el MC, la fracción menor de 10 KDa fue inyectada en un HPLC utilizando la metodología Fase Reversa, con ayuda de una columna C18, la muestra fue monitoreada a dos longitudes de onda 214 y 254 que corresponden a las longitudes de onda a las que vibran los grupos carbonilo y el enlace peptídico.

Después de todas las corridas de prueba en la que se probaron la influencia de diversos parámetros: como la longitud de la columna, la composición de la fase móvil, la velocidad de flujo y el volumen de muestra inyectado, por comparación de los cromatogramas se obtuvieron las condiciones óptimas que son las mostradas en la Tabla 13.

Tabla13. Parámetros utilizados en la corrida de los péptidos de *Bt* en HPLC.

Parámetro	
Columna	Hibart C18
Tamaño de poro	5 μm
Fase móvil	98% H ₂ O, 2% ACN
Método	Isocrático
Flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	20 μl
Tiempo de retención	1°Pico 2.0 min 2° Pico 2.50 3er pico 2.65



En el cromatograma de la Figura 23 A se observa una señal muy intensa a 2.0 min y otra de muy baja intensidad entre 2.5 y 3.0 min. Al expandir las escalas (Figura 23 B) se observa un doble pico que inicia en 2.40 min y termina en 2.7 min. Se puede discernir que esta muestra contiene grupos químicos altamente polares, pues los tiempos de retención no son tan grandes a comparación del estándar (Sigma Aldrich No H2016).

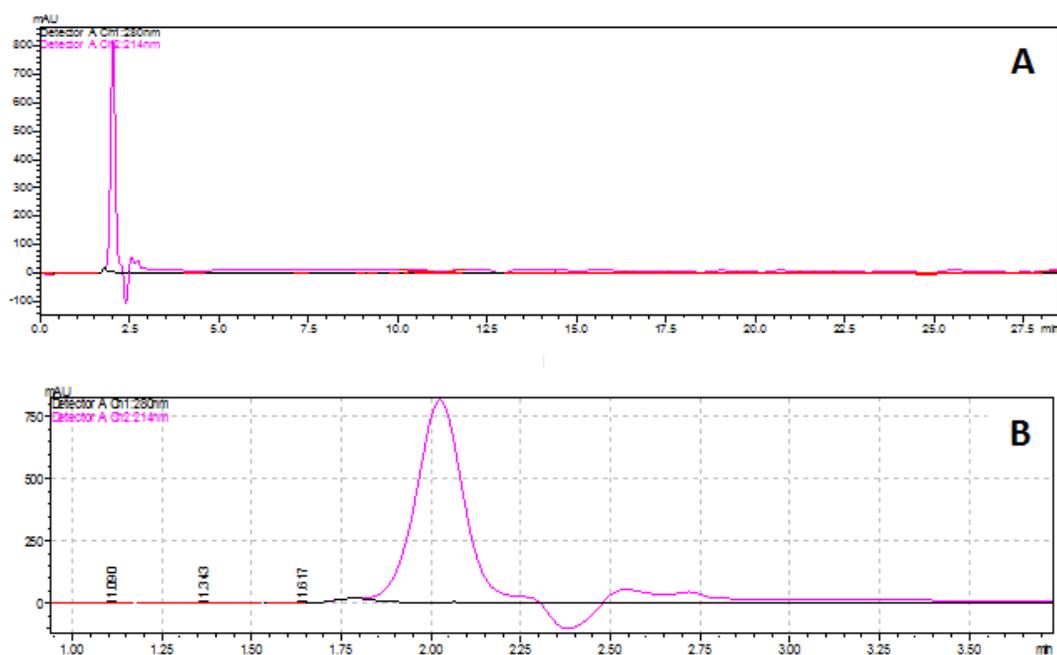


Figura 23. Cromatogramas, HPLC, para la separación del medio condicionado de Bt

Como se observa en el cromatograma, los picos no se pudieron separar completamente lo cual sugiere que son moléculas que tenían algún tipo de interacción. También se observa que la señal



mayoritaria es asimétrica, dado la posibilidad de que se trate de isómeros.

Sin embargo debido al tiempo y a la cantidad de muestra con la que se contaba no fue posible purificarla, se pretende que en un futuro se separen las fracciones y a ambas se les realice un bioensayo para conocer el efecto de cada una de ellas en la proliferación celular, pues en casos como PSK donde se han identificado dos factores activos denominados PSK- α y PSK- β , cinco y cuatro aminoácidos respectivamente, PSK - α estimula fuertemente la proliferación aun cuando la cantidad presente en el MC es 20% menor que PSK- β (Yang, 1999).

3.3) Espectroscopia RMN ^1H .

A la muestra menor a 10 KDa, también se le realizó un análisis mediante RMN ^1H ante la posibilidad de tener más compuestos unidos al factor y de esta manera tener una idea de los grupos químicos que lo conforman (Figura 24 y 25).

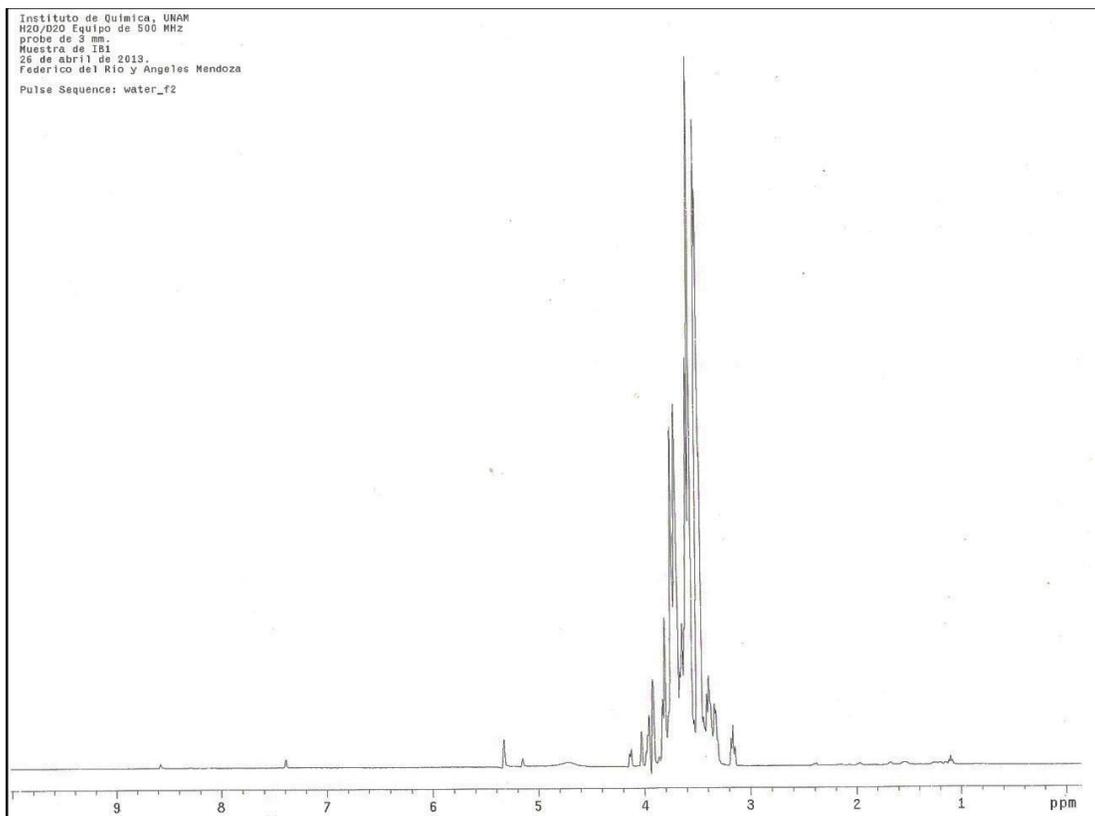
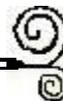


Figura 24. Espectro de RMN en una dimensión, para la muestra ultracentrifugada de 10 KDa, en ella se observa una señal entre 4 y 3 ppm.

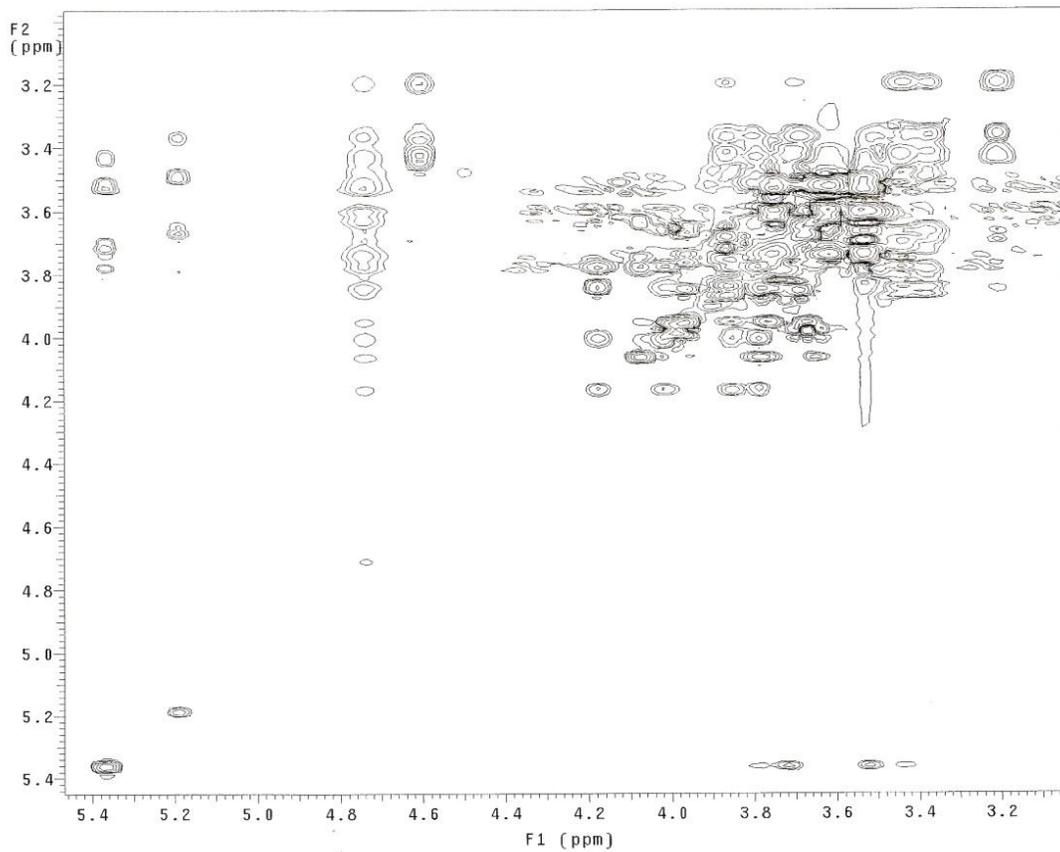
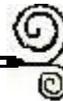


Figura 25. Espectro de RMN en dos dimensiones, para la muestra ultracentrifugada de 10 KDa.



Este espectro mostró una señal intensa entre 4 y 3 ppm que corresponde a la señal de carbohidratos, 6–3 ppm; (Bubb, 2006; Vliegthart, 2006) y no las señales características de los péptidos, las cuales se localizan en la región de 3-0 ppm H alifáticos, 0-1 ppm H metilos, 8-7 ppm H aromáticos, 8-6 ppm cadena lateral N-H ppm y 10-7 ppm para aminas (Poulsen,2002). En el espectro de dos dimensiones las manchas que caracterizan a los carbohidratos se hacen más evidentes; sin embargo, a pesar de que la muestra contiene una gran cantidad de carbohidratos también se puede observar alguna señal, espectro una dimensión, y una mancha, dos dimensiones, en la región de las aminas. Si bien esta señal es casi imperceptible se debe quizá a la interferencia de una gran cantidad de carbohidratos presentes en la muestra, los cuales no permiten percibir la señal peptídica.

Estas señales en el espectro no son de extrañar, pues en plantas, algunas moléculas señalizadoras, como los péptidos, están sujetas a procesos proteolíticos y/o varias formas de modificaciones postraduccionales (Matsubayashi, 2010).

Las modificaciones postraduccionales también puede influir en la estructura y /o el plegamiento mediante interacciones estéricas con la estructura principal del péptido. Un claro ejemplo y análogo a PSK es PSY1, un estudio en el que se realizó enriquecimiento de péptidos sulfatados utilizando suspensiones celulares de *Arabidopsis*, después de la separación de los péptidos por una



columna de DEAE Sephadex y su análisis por LC-MS se identificó un pico con patrón de fragmentación característico de los péptidos tirosina sulfatados. El fragmento iónico de LC-MS patrón sugiere que el péptido está glicosilado con tres unidades de pentosa, todas las pentosas fueron identificadas como L arabinosa (L Ara).

Debido a que en el espectro de RMN se observó una señal intensa en la región donde los azúcares presentan vibración, se midió la cantidad de carbohidratos en la muestra, la cual era de $66.96 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y la de proteína $9.87 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Para tratar de separar los carbohidratos del posible componente proteico, la muestra se fraccionó en una columna de intercambio iónico (Tabla 13).

Tabla 14. Contenido de carbohidratos y proteínas en las fracciones de MC, purificado en una columna de DEAI Sephadex A25.

Fracción	$\mu\text{g}/\text{mL}$ carbohidratos	$\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína
Muestra	66.96	9.87
Lavado	4.44	0.55
20 mM	6.46	5.80
200 mM	22.92	0.65
400 mM	12.24	0.45
600 mM	2.35	0.34



En todas las fracciones se observa que la cantidad de carbohidratos es mayor que la del péptido y que en la fracción eluida con 200 mM de acetato de amonio es la más rica en azúcares. Mientras que en la fracción 20 mM la relación azúcar péptido fue 1.1. Sin embargo, ya no se hizo el bioensayo con esta fracción.

A futuro se requiere realizar el bioensayo con las fracciones eluidas de la columna de intercambio iónico (tabla 13) y repetir el ensayo del tratamiento del MC con proteasa. Estos dos experimentos permitirían demostrar la naturaleza química del factor proliferativo y continuar con su purificación para la determinación de su estructura.



VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los experimentos realizados se encontró una fracción activa del MC aislada de CS de Bt (callo heterogéneo), la cual incrementa el crecimiento de los cultivos celulares de una de las líneas, 3 Bt. Este crecimiento en base a peso seco, ocurre a una densidad celular inicial de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, esta densidad a comparación de otras dos que fueron probadas tuvo un incremento significativo, por lo cual se considera que hay un(os) compuesto(s) que están interviniendo en el crecimiento celular, aún falta conocer a qué nivel se está presentando el estímulo, por lo que serán necesarias otras pruebas de carácter molecular. Es importante resaltar que para que se observe un crecimiento celular, el cultivo debe ser joven, lo que contrasta con *taxus s.p* ya que en la literatura (Kim, 2000) se ha reportado que mientras más viejo es el cultivo se logra obtener una mayor cantidad de metabolito secundarios.

Si bien, no se pudo elucidar la naturaleza del factor, así como la estructura química del mismo, se obtuvo información muy importante de la posible interacción y fuerte afinidad que presenta hacia otros compuestos, que de acuerdo al análisis espectroscópico realizado se trata de carbohidratos.



IX. ANEXO

1) PROLIFERACIÓN DE CALLO.

1.1) Preparación de medios de cultivo.

A continuación se muestra la cantidad de macro y micro elementos, así como vitaminas a una concentración 100X utilizadas en la elaboración de medios de cultivo MS para Bt.

Tabla 15. Soluciones stock para medios de cultivo MS.

Soluciones	Compuesto	mg/L	[M] final
MS I: Nitratos	KNO ₃	1900	1.88x10 ⁻²
	NH ₄ NO ₃	1650	2.06x10 ⁻²
MS II: Sulfatos	MgSO ₄ 7H ₂ O	370	1.50x10 ⁻³
	MnSO ₄ H ₂ O	16.9	9.99x10 ⁻⁵
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	2.99x10 ⁻⁵
	CuSO ₄ 5H ₂ O	25x10 ⁻³	1.00x10 ⁻⁷
MS III:	CaCl ₂ 2H ₂ O	440	3.00x10 ⁻³
Halógenos			
	KI	0.83	5.00x10 ⁻⁶
	CoCl ₂ 6H ₂ O	25x10 ⁻³	1.00x10 ⁻⁷
MS IV:	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	170	
	H ₃ BO ₃	6.2	1.00x10 ⁻⁴
	NaMoO ₄ H ₂ O	25x10 ⁻³	



MS V:	FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8	1.00x10 ⁻⁴
Quelantes			
	Na ₂ EDTA	37.3	1.00x10 ⁻⁴
Vitaminas	Myo-inositol		4.90x10 ⁻⁴
	Ácido nicotínico		4.66x10 ⁻⁴
	Ácido clorídrico piridoxinico		2.40x10 ⁻⁶
	Ácido clorídrico tiaminico		3.00x10 ⁻⁷
Fuentes de nitrógeno orgánico	Glicina		3.00x10 ⁻⁵
Fuentes de carbono	Sacarosa		8.80x10 ⁻²

2) ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN.

2.1) Condiciones de incubación para CS.

Todos los cultivos en suspensión se incubaron dentro del invernadero, en una agitadora *New Brunswick Scientific* a 100 rpm, durante las 24 hs a 22°C. La agitadora se encuentra sellada con papel estraza, por lo que la luz que paso a los cultivos fue poca o muy escasa.



2.2) Condiciones de incubación para callos.

Los callos tanto de Bt como de las líneas se mantuvieron en el cuarto de incubación dentro del lab 116, CTV, en fotoperiodo de 8 horas oscuridad y 16 de luz, a una temperatura de entre 20-22 °C.

3) CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO.

3.1) Cuantificación de proteína.

Para poder medir la proteína fue necesario realizar las curvas patrón para cada uno de los métodos desarrollado.

3.1.1) Curva patrón prueba de Lowry.

Para la curva se utilizó una solución de 1.00 mg/ mL de seroalbúmina en un rango de 0-100 µg.

Tabla 16. Curva patrón Lowry.

µg/µL	ABS	µg/ML	ABS
0	0.000	60	0.329
10	0.046	70	0.330
20	0.095	80	0.347
30	0.125	90	0.464
40	0.190	100	0.498
50	0.249		

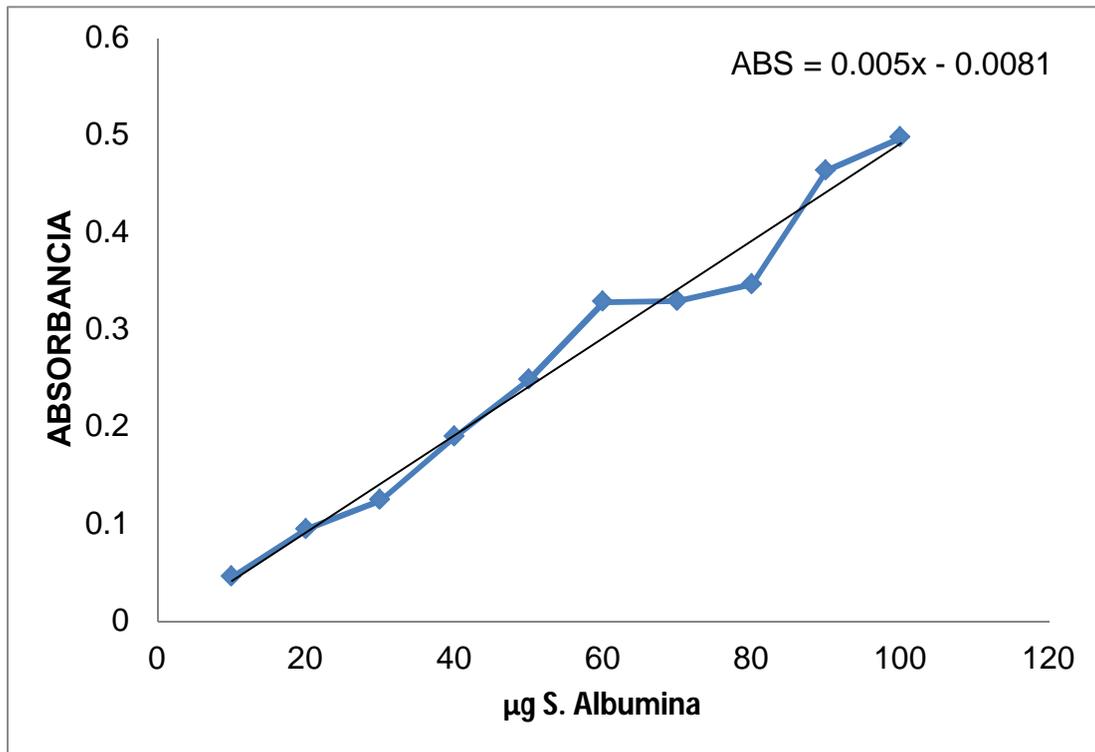
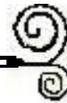


Figura 26. Curva patrón para método de Lowry.

3.1.2) Curva patrón de ácido bicinconínico.

Para la curva se utilizó una solución de 1.00 mg/ mL de seroalbúmina en un rango de 0-100 µg.

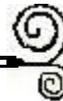


Tabla 17. Curva patrón BCA

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	ABS
0	0
20	0.567
40	0.597
60	0.876
80	1.121
100	1.850

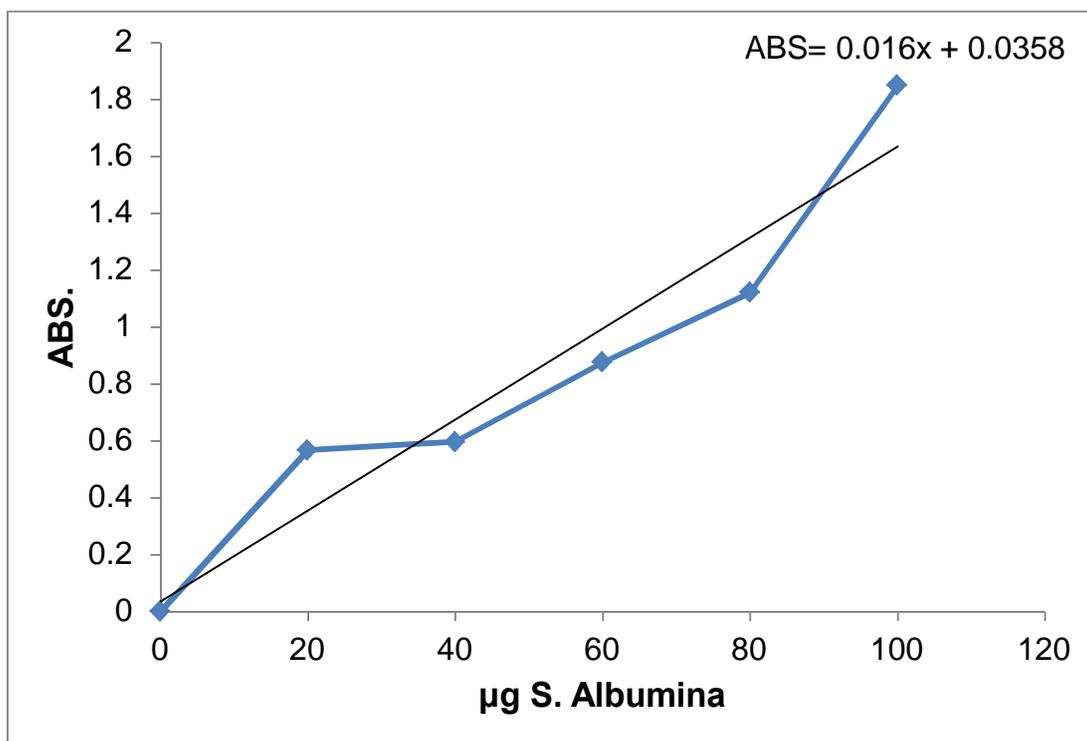


Figura 27. Curva patrón para método del BCA.



4) SEPARACIÓN DEL COMPUESTO POR MEDIO DEL HPLC.

4.1) Buffers de corrida para HPLC.

Para preparar algunas de las fases de corrida se prepararon algunos buffers es el caso de b.A. y b.B , en cuyo caso se preparó una solución stock SB.

Tabla 17. Stock para buffer de corrida

SB	100 mL
TFA	7.5 mL
TEA	5.0 mL
ACN	25 mL
H ₂ O	62.5 mL

De esta solución stock se prepararon las fases de corrida b.A. y b.B.

Tabla 18. Buffers de corrida para HPLC

	SB	ACN	H₂O
b.A.	2.5 mL	25.0 mL	222.5 mL
b.B.	2.5 mL	187.5 mL	60.0 mL

Las fases de corrida b.C. y b.D. se prepararon de la siguiente manera.



Tabla 19. Buffers de corrida para HPLC

	TFA	ACN	H ₂ O
b.C.	0.5 mL	25.0 mL	475.0 mL
b.D.	0.5 mL	375.0 mL	125.0 mL

4.2) Estándar

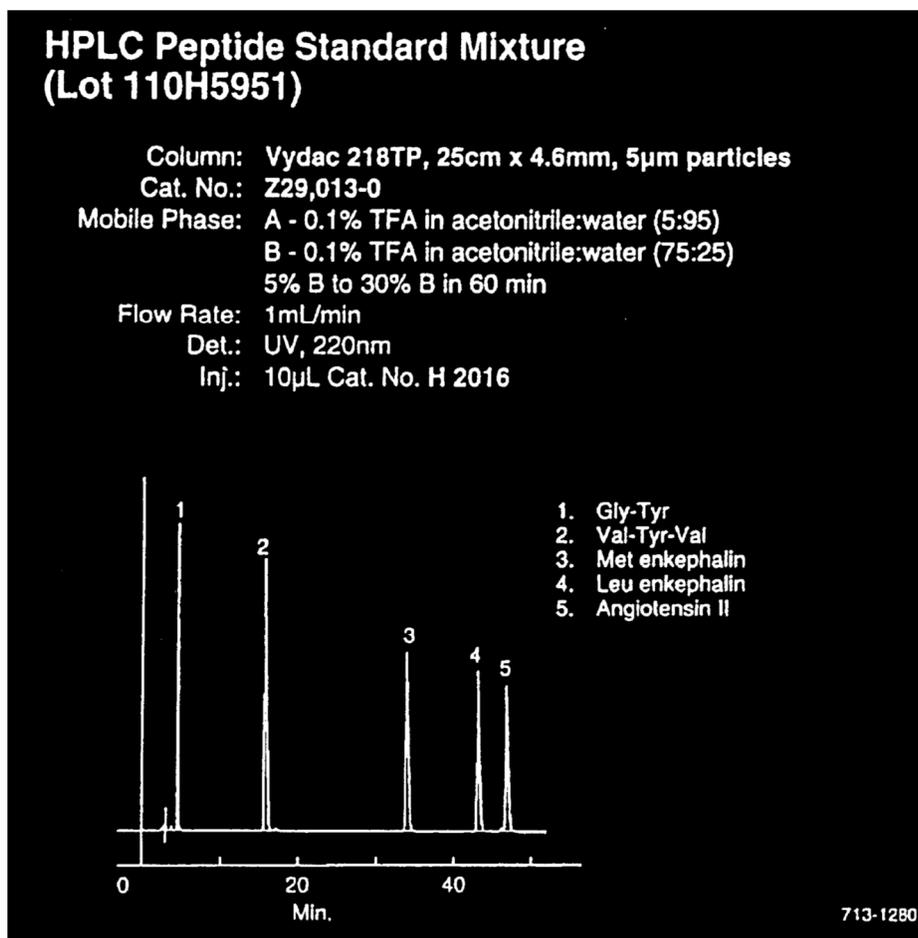


Figura 28. Cromatograma del estándar para péptidos de bajo peso molecular (Sigma Aldrich H 2016).



5) RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR ^1H .

5.1) Determinación de carbohidratos.

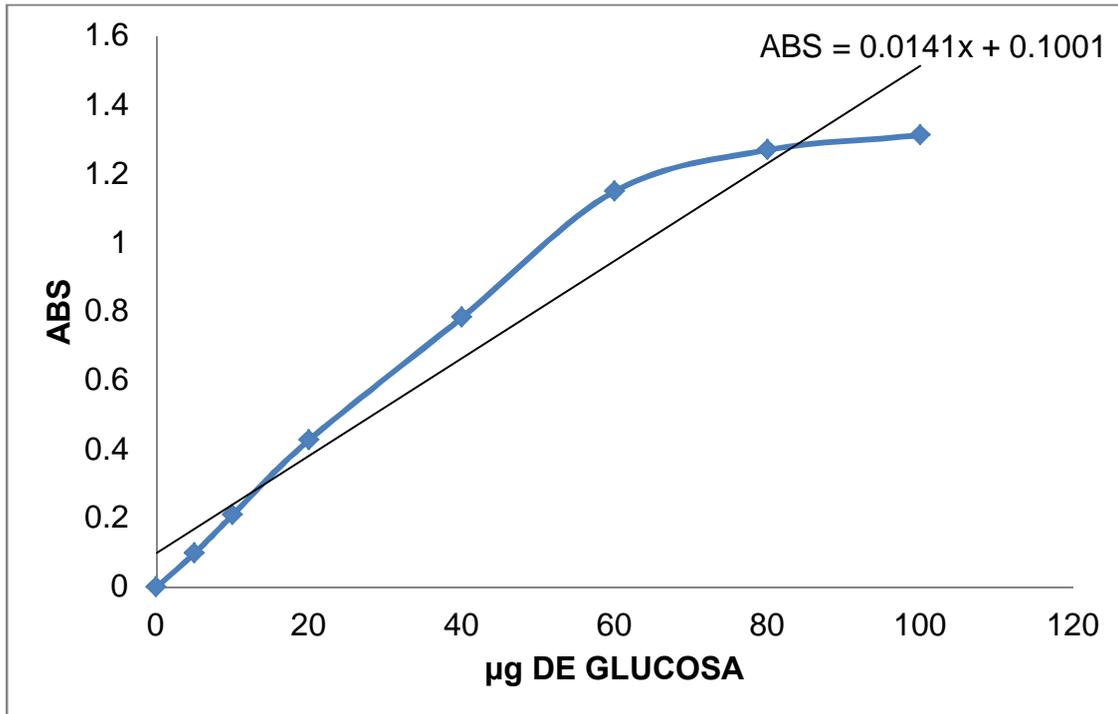


Figura 27. Curva patrón para método del BCA



X. REFERENCIAS

- ✦ Benitez García Israel (2009), Tesis “Análisis del contenido de Taxol y otros taxano y su relación con la expresión del gen ts en cultivos in vitro de *Taxus globosa* Schtdl” *IPN*, pag. 39.

- ✦ Carr David (2002) *The Handbook of the Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC* 3° Edición.

- ✦ Dörnenburg Heike y Knorr Dietrich (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolites production in plant cell culture, *Enzyme and Microbial Technology*, 17 pag. 674-684.

- ✦ Douglas Hayworth, *Chemistry of protein assays Thermo scientific Protein methods library*.

- ✦ E.R.M. Wickremesinhe, R.N. Arteca (1993) *Taxus callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production, Plant Cell Tiss Org*, 35 pag. 181–193.



🌿 F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science* 161 pag. 839-859.

🌿 Flemming M. Pulsen 2002 a brief introduction to NMR spectroscopy of proteins pag. 12-18.

🌿 G. Calva- Calva, F. Esparza García, J. Pérez Vargas, V. Martínez Juárez, S. Silvia Cervantes y C López Sánchez, (2002) Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y remoción de xenobióticos, *Avance y Perspectiva* 21 pag. 308.

🌿 J.S. Alford (2006), Bioprocess control: Advances and challenges, *Computers and chemical Engineering* 30 pag. 1464-1475.

🌿 Johannes F. G. Vliegthart, 2006 Introduction to MNR spectroscopy of carbohydrates. American Chemical Society, 1 pag 1-5.



🌿 K. Brunakova, Z. Babincova, E. Cellárová (2005) Production of taxanes in callus and suspension cultures of *Taxus baccata* L. *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, Springer, pag 567-574.

🌿 K. Brunakova, Z. Babincova, M. Takác, E. Cellárová, (2004) Selection of callus cultures of *Taxus baccata* L. as a potential source of paclitaxel production, *Engineering in Life Sciences*, 4 pag. 465–469.

🌿 Kanok-on Woragidbumrung, Penporn Sae-Tang, Hui Yao, Jin Han, Somchai Chauvatcharin, Jian-Jiang Zhong (2001) Impact of conditioned medium on cell cultures of *Panax notoginseng* in an airlift bioreactor, *Process Biochemistry* 37 pag. 209–213

🌿 Kim, B., Gibson, D.M., Shuler, M.L. (2006) Effect of the plant peptide regulator, phyto-sulfokine- α , on the growth and taxol production from *taxus* sp. suspension cultures, *Biotechnology and Bioengineering*. 95 pag 8-14.

🌿 Measuring Cell Viability / Cytotoxicity
https://www.dojindo.com/Protocol/Cell_Proliferation_Protocol_Colorimetric.pdf



-
- M. H. Zenk (1977) Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*, *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application* pág. 20-43.

 - Miung-Hwan Kim, Su-Hwan Chun, DoNG-II Kim (2000) Growth promotion of *Taxus brevifolia* cell suspension culture using conditioned medium, *Biotechnol. Bioprocess Eng*, 5 pag 350-354.

 - M.W. Fowler, G.S. Warren and M. Moo-Young, (1992) The Cell Biology of Plant Cell Culture Systems, *Plant Biotechnology*, pag. 11, 64, 73.

 - S. Ramachandra Raol, G.A. Ravishankar (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnology Advances* 20 pag. 102.

 - Ramage, C. M. and Williams, R. R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, **38**, 116–24.



- 🍃 Sigma Aldrich product information Trypan Blue, Product Nos. T 8154, T 6146 and Z 35,962-9 (H7901)
- 🍃 William A. Bubb (2006), NMR spectroscopy in the study of carbohydrates characterizing the structural complexity, Concepts in Magnetic Resonance Part A 19, pag 1-7