



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROVENIENTES DE MEDIOS
CONDICIONADOS POR CÉLULAS VEGETALES DE DIVERSAS ESPECIES**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
Q.F.B. CARMEN NAYELI SOTO VARGAS**

TUTOR PRINCIPAL

**DRA. IRMA OFELIA BERNAL LUGO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**DRA. GEORGINA GURROLA BRIONES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: CORZO BURGUETE GERARDO ALFONSO

VOCAL: LARA NUÑEZ AURORA

VOCAL: CHÁVEZ ÁVILA VICTOR MANUEL

VOCAL: JIMÉNEZ ESTRADA MANUEL

SECRETARIO: LOZA TAVERA HERMINIA DE JESÚS

Sitio donde se desarrolló del tema:

**Laboratorio 104, Conjunto E, Departamento de Bioquímica,
Facultad de Química, U.N.A.M.**

Director de Tesis

Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo

Director de Técnico

M. en C. María Teresa Olivera Flores

Sustentante

Q.F.B. Carmen Nayeli Soto Vargas

Agradecimientos

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me fue otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

A la Facultad de Química de la U.N.A.M. por el apoyo económico PAIP 5000-9114 otorgado a la Dra. Irma O. Bernal Lugo y que sirvió para la compra de reactivos necesarios para la realización de los experimentos realizados en esta tesis.

A la Dra. Irma O. Bernal Lugo por la oportunidad y confianza brindadas hacia mí para formar parte de su equipo de investigación, así como por la orientación brindada para el desarrollo del proyecto de maestría.

A la M. en C. María Teresa Olivera Flores por la confianza, orientación, cariño y por tratarme como a una más de sus alumnos. En su laboratorio se llevó a cabo toda la parte concerniente al cultivo de tejidos vegetales y células en suspensión.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y a la Dra. Georgina Gurrola Briones por su asesoría dentro del comité tutor.

A la Dra. Aurora Lara Nuñez, a la Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera, al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, al Dr. Manuel Jiménez Estrada y al Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete, miembros del jurado, por sus observaciones y correcciones a la presente tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio 112 de Cultivo de Tejidos Vegetales por acompañarme en esta aventura y hacer los días de laboratorio más divertidos, en especial a Araceli Arandal quien me compartió sus conocimientos de cultivo de tejidos vegetales y de otros muchos temas, a Claudia Peralta por su compañía y apoyo en la preparación de medios de cultivo y siembra en las campanas de flujo laminar, y a Gary quien me proporcionó callos de sus cultivos de *Taxus globosa* y muchos momentos divertidos. A Katina Ortega por ser una de las mejores compañeras de laboratorio que pude haber tenido.

A Iván y Karina del laboratorio de microscopía del conjunto E, de la Facultad de química, por todas las veces que me prestaron el microscopio para tomar las fotos de las células en suspensión para los bioensayos.

A la Q. Laurel Fabela por el préstamo y apoyo en la operación de los equipos para liofilizar, cuantificar proteína en placas y para la visualización de los geles de acrilamida.

Al Dr. Felipe Cruz García por el préstamo de equipos y reactivos cuando fueron necesarios, así como a su técnico académico Yuridia Cruz González por el apoyo con el uso de equipos y técnicas.

A la Dra. Marina Gavilanes y a mi compañero, el M. en C. Francisco Morales por compartirme su técnica para la tinción de los geles de plata.

A mis papás y mis hermanos quienes siempre me han apoyado y ayudado a cumplir mis metas, gracias por todo.

A mi compañero de vida Ricardo por su apoyo, por desvelarse conmigo para los exámenes y proyectos, por alentarme a terminar y por creer en mí.

ÍNDICE

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS PROVENIENTES DE MEDIOS CONDICIONADOS POR CÉLULAS VEGETALES DE DIVERSAS ESPECIES 1

ABREVIATURAS 1

RESUMEN..... 2

INTRODUCCIÓN 3

1. Péptidos de secreción..... 4

 1.1. Biosíntesis de los péptidos 5

 1.2. Clasificación de los péptidos..... 5

 1.3. Modificaciones post-traduccionales..... 8

 1.4. Procesamiento proteolítico 10

 1.5. Estructura y función de los péptidos pequeños modificados con sulfatación en las tirosinas 11

 1.5.1. Fitosulfoquina: PSK 11

 1.5.2. PSY1 13

 1.5.3. RGF1 14

2. Técnicas para la identificación de péptidos 15

 2.1. Purificación guiada por bioensayos 15

 2.2. Genética clásica 15

 2.3. Bioinformática 16

3. Efecto de la adición de péptidos en la producción de metabolitos secundarios 16

4. Estudios recientes de peptidómica para la identificación de péptidos bioactivos en plantas..... 17

5. Características e importancia de las especies vegetales utilizadas..... 18

 5.1. *Bouvardia ternifolia* 18

 5.2. *Tagetes erecta* 19

 5.3. *Taxus globossa*..... 19

HIPÓTESIS 21

OBJETIVO GENERAL 21

OBJETIVOS PARTICULARES 21

MATERIALES Y MÉTODOS..... 22

1. Material biológico..... 22

2.	Medios de cultivo	22
2.1.	<i>Tagetes erecta</i>	22
2.2.	<i>Bouvardia ternifolia</i>	23
2.3.	<i>Taxus globosa</i>	23
2.4.	Medio para bioensayo con células de espárrago	23
3.	Obtención de las líneas celulares	24
3.1.	Líneas celulares de <i>T. erecta</i>	24
3.2.	Líneas celulares de <i>B. ternifolia</i>	25
3.3.	Líneas celulares de <i>T. globosa</i>	25
4.	Mantenimiento de callos	25
4.1.	<i>Tagetes erecta</i>	25
4.2.	<i>Bouvardia ternifolia</i>	26
4.3.	<i>Taxus globosa</i>	26
5.	Mantenimiento de células en suspensión	26
6.	Recolección del medio condicionado	27
7.	Concentración del medio condicionado	28
8.	Extracción de proteínas del medio condicionado con el método del Fenol/Acetato de amonio-Metanol ...	28
9.	Fraccionamiento inicial con la columna DEAE Sephadex A-25	28
10.	Determinación de la cantidad de proteína con el método del Ácido Bicinchonínico	29
11.	Determinación de la concentración de carbohidratos presentes en las fracciones	29
12.	Obtención de cladodios de espárrago	29
13.	Bioensayo con células de cladodios de espárrago	30
14.	Comprobación de la naturaleza peptídica de las fracciones activas	31
15.	Curvas de crecimiento de <i>B. ternifolia</i> , <i>T. erecta</i> y <i>T. globosa</i>	31
16.	Identificación de los componentes de las fracciones que mostraron actividad mediante la técnica de HPLC	32
17.	Identificación del peso molecular de los componentes presentes en el medio condicionado	33
18.	Tinción de los geles con el Método de Vorum.	34
19.	Separación de las proteínas mediante filtración en gel	36
20.	Ensayo de la actividad de las fracciones obtenidas a partir de la columna Bio-Gel P10	36
21.	Ensayo de la actividad de las fracciones de <i>T. globosa</i> que no se pegan a la columna de DEAE Sephadex A-25	36

22.	Fraccionamiento con la columna Superdex Peptide 10/300 GL	37
23.	Eliminación de la fase móvil de las fracciones eluídas de la columna Superdex Peptide 10/300 GL	38
24.	Bioensayo con las fracciones eluídas de la columna Superdex Peptide 10/300 GL.....	38
24.1.	Bioensayo en células dispersas de espárrago; incremento del número de células	38
24.2.	Bioensayo en cultivos en suspensión celular de la especie de donde se extrajo el MC; incremento del PCV	39
24.2.1.	<i>T. erecta</i>	39
24.2.2.	<i>B. ternifolia</i>	39
24.2.3.	<i>T. globosa</i>	40
24.3.	Bioensayo en cultivos en suspensión celular de la especie de donde se extrajo el MC; incremento del peso seco	41
24.3.1.	<i>T. erecta</i>	41
24.3.2.	<i>B. ternifolia</i>	42
24.3.3.	<i>T. globosa</i>	43
25.	Determinación de la secuencia de aminoácidos	43
	RESULTADOS.....	44
1.	Medición de la actividad mitogénica de los MC totales en las células dispersas de espárrago	44
2.	Medición de la actividad mitogénica de las fracciones de MC eluidas de la columna Sephadex A-25 en las células dispersas de espárrago.....	45
3.	Comprobación de la naturaleza peptídica de los componentes que incrementan la proliferación celular en los Medios Condicionados.....	47
4.	HPLC de fase reversa para la purificación de las fracciones que mostraron actividad mitogénica	50
5.	Electroforesis en geles de Tris-tricina para determinar los pesos moleculares de los compuestos presentes en las fracciones de MC con actividad mitogénica.	54
6.	Filtración en gel de las fracciones que mostraron actividad	57
7.	Ensayo de la actividad de las fracciones eluidas de la columna de filtración en gel Bio-Gel P-10.....	59
8.	Fraccionamiento a través de la columna Superdex Peptide 10/300 GL	60
9.	Bioensayo de las fracciones eluídas de la columna Superdex Peptide 10/300 GL.....	64
10.	Bioensayo en células dispersas de espárrago; incremento del número de células	64
11.	Bioensayo en cultivos en suspensión celular de la especie de donde se extrajo el MC; incremento del PCV y aumento en el peso seco	66
12.	Determinación de la secuencia de aminoácidos de los compuestos presentes en las fracciones activas ..	69

DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXO	84
1. Curva estándar de ácido bichonínico.....	84
2. Curva estándar de glucosa para la determinación de carbohidratos	85
3. Curvas de crecimiento de <i>B. ternifolia</i> y <i>T. erecta</i>	86
4. Análisis de huella peptídica	88

ABREVIATURAS

AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
BA	Benciladenina
BSA	Albumina de suero bovino (Bovine Serum Albumin, por sus siglas en inglés)
HPAT	Hidroxi prolina O-arabinosil transferasa
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas
HypSys	Sistemina rica en hidroxiprolina
JA	Ácido jasmónico
LRR-RK	Receptor de cinasa rico en repetidos de leucina
MC	Medio condicionado
ORF	Marcos de lectura abiertos (Open Reading frame, por sus siglas en inglés)
PAPS	3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato
PEP	Péptido elicitor de plantas
PH4	Prolil-4-hidroxilasa
PSK	Fitosulfoquina
RGF	Factor de crecimiento de la raíz meristemática
rpm	Revoluciones por minuto
TDIF	Factor inhibidor de la diferenciación del elemento traqueal
TPST	Tirosilprotein sulfotransferasa

RESUMEN

Una alternativa para la producción industrial de metabolitos secundarios, con interés farmacológico, son los cultivos de células vegetales en suspensión. Sin embargo, su utilización con tal propósito no se ha difundido debido a que los sistemas aún presentan algunos problemas técnicos, como son: el bajo rendimiento en la producción de metabolitos secundarios, el lento crecimiento celular y la inestabilidad genética. Se ha demostrado que existen péptidos que incrementan la proliferación celular, los cuales, son secretados en los medios condicionados por células vegetales. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue la búsqueda de estos péptidos mitogénicos en medios condicionados por células vegetales de especies productoras de metabolitos secundarios de interés farmacológico no estudiadas anteriormente.

Se utilizaron cultivos en suspensión de tres especies cuyos metabolitos son o podrían ser de interés industrial, *Taxus globosa* cuyo metabolito denominado paclitaxel es usado en el tratamiento de cáncer, *Tagetes erecta* cuyo metabolito, la luteína, es utilizado como colorante y como suplemento alimenticio; y por último *Bouvardia ternifolia* cuyo metabolito secundario bouvardina es un potencial agente antitumoral. Los medios condicionados se colectaron de cultivos de 7, 14 y 21 días, después se extrajeron las proteínas con fenol y se precipitaron con acetato de amonio. La pastilla se lavó con metanol para eliminar el acetato de amonio, se secó y se disolvió en buffer. Las proteínas de la pastilla se fraccionaron en una columna de intercambio aniónico y posteriormente por cromatografía de filtración. Las fracciones activas se localizaron mediante tres tipos de bioensayos; proliferación de células aisladas de cladodios de espárrago, por incremento en el volumen del paquete celular, y mediante el incremento en peso seco de células homólogas. La naturaleza peptídica de los factores proliferativos, en cada uno de los medios condicionados, se demostró a través de su inactivación por proteasas. Se logró identificar al menos una fracción cromatográfica con actividad proliferativa en cada uno de los medios condicionados. Finalmente, por medio de la técnica de espectrometría de masas acoplada a tiempo de vuelo se identificaron a los péptidos DRVYLHPF, GVYLHPF, YGGFL, GARRFRRK y PSK en la fracción activa de la columna Superdex Peptide 10/300 GL en el medio condicionado de *T. globosa*. Estos péptidos podría ser susceptibles a las modificaciones post-traduccionales características de los péptidos de secreción. No se determinó si las tirosinas se encontraban modificadas con sulfato o la prolinas con algún azúcar.

INTRODUCCIÓN

Las plantas, debido a su naturaleza sésil, necesitan responder rápidamente a cambios en su ambiente desde variaciones en la humedad y temperatura hasta ataques por depredadores y patógenos, por lo que han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten su supervivencia. Entre éstos, se encuentra la producción de metabolitos secundarios, los cuales no afectan directamente el crecimiento de la planta, pero si ayudan en la adaptación de ésta al medio ambiente, le sirven como atrayentes de polinizadores, dispersores de semillas y como defensa contra patógenos, herbívoros e incluso le sirven contra el estrés abiótico inducido por la luz ultravioleta, y también contribuyen al aroma, al sabor de las frutas, y al color de las flores (1).

Debido a su actividad biológica tan significativa, los metabolitos secundarios, han sido usados desde hace siglos en la medicina tradicional. En la actualidad éstos son una fuente muy importante de fragancias naturales, insecticidas, colorantes y saborizantes, sin embargo su uso como fármacos es de primordial interés (2).

La obtención de los metabolitos secundarios se realiza a partir de tres vías principales; I) Extracción a partir de sus fuentes naturales, II) Síntesis química total o parcial, y III) Producción heteróloga (1). Sin embargo, debido al crecimiento de la población y al incremento en la demanda de fármacos, se tienen inconvenientes con cada uno de los métodos como son: la limitada disponibilidad de los compuestos, que generalmente representan menos del 1% del peso seco de la planta (3), la dificultad de su síntesis química por la presencia de múltiples centros quirales y el uso de disolventes orgánicos agresivos con el ambiente (1); Y la falta de vías de producción de metabolitos secundarios totalmente caracterizadas para poder ser introducidas en otras especies (1).

Cómo solución a los inconvenientes de los métodos de obtención de metabolitos secundarios, la tecnología de cultivo de tejidos vegetales permite una producción sostenible de éstos a partir del cultivo de células en suspensión mediante el uso de bioreactores, sin embargo, aún debe dirigirse la investigación hacia la resolución de los problemas con su escalamiento a nivel industrial, los cuales incluyen: la inestabilidad de las líneas celulares, los bajos rendimientos en la producción de los metabolitos y la lentitud del crecimiento celular (4,5), este último problema se debe a que al establecer un cultivo de células en suspensión se requiere de un inóculo suficiente de células para que se lleve a cabo la proliferación celular. Este problema puede ser solucionado con la ayuda de los péptidos con actividad mitogénica en plantas que promueven la proliferación celular en cultivos en suspensión de baja densidad (6), razón por la cual el objetivo de este trabajo es el aislamiento de péptidos con actividad mitogénica en medios condicionados por cultivos celulares de especies vegetales de interés comercial como son: *B. ternifolia*, *T. erecta* y *T. globosa*. Se le denomina medio condicionado al medio resultante tras la eliminación de las células en suspensión de un cultivo celular de rápido crecimiento y su posterior concentración.

1. Péptidos de secreción

Los péptidos de secreción son moléculas señalizadoras importantes en la comunicación célula-célula tanto en animales como en plantas. Hasta antes de 1991 no se sabía si al igual que los animales, las plantas utilizaban péptidos como moléculas reguladoras. Sólo se conocían a las fitohormonas, moléculas orgánicas de baja masa molecular como las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico, además de los brasinoesteroides, como moléculas reguladoras del crecimiento (6).

El primer péptido funcional identificado en plantas fue la sistemina en tomate. Éste es un péptido de 18 aminoácidos que induce la expresión rápida de genes de respuesta a defensa a través de su transporte sistémico desde el sitio de daño hacia las otras hojas (7). Actualmente se conocen más de una docena de péptidos reconocidos como hormonas que coordinan diferentes funciones en plantas, entre éstas se encuentran: señalización en respuesta a defensa, proliferación celular y diferenciación, mantenimiento de la identidad de células madre en meristemas de brotes apicales, la auto-incompatibilidad en especies de crucíferas, la abscisión de órganos florales y la formación del patrón de estomas (8).

Tras la secuenciación del genoma de *Arabidopsis*, se han podido identificar 979 genes putativos (SignalP score > 0.75) de péptidos secretados, con marco de lectura abierto de entre 50 y 150 aminoácidos. Estos 979 genes incluyen muchos péptidos no caracterizados funcionalmente, además de hormonas peptídicas ya caracterizadas y péptidos relacionados a defensa, como las defensinas. Aunque el porcentaje total de péptidos secretados que funciona como hormonas peptídicas es difícil de estimar actualmente, se espera que algunos de los productos de ellos sean moléculas de señalización intercelular (9). Además también se sabe que el genoma de *A. thaliana* codifica para más de 6000 receptores tipo cinasa, algunos de sus ligandos ya han sido identificados, y se espera que una proporción considerable de los péptidos codificados por *A. thaliana* funcionen como ligandos para estos receptores (10).

En la mayoría de los casos, los péptidos son secretados hacia el exterior de las células y actúan en células vecinas, permiten la comunicación local célula-célula, gobiernan la organización de varios tejidos y órganos, por ejemplo: CLV3, TDIF, RGF1 y EPF1/EPF2, los cuales participan en mantener el tamaño del meristemo apical del brote, el mantenimiento de las células madre en la vasculatura, el de los meristemas en la raíz y la regulación del desarrollo estomatal, respectivamente (11).

Los péptidos en plantas, generalmente tienen una masa molecular menor a 10 kDa, y se dividen en dos categorías; péptidos bioactivos que son producidos por la acción selectiva de peptidasas sobre proteínas precursoras más grandes y péptidos de degradación los cuales resultan de la actividad proteolítica durante el recambio proteico. Ambos grupos de péptidos son producidos por proteólisis, aunque, difieren en la forma de

actuar en la célula. Los péptidos bioactivos desempeñan funciones clave en varios aspectos de la regulación del crecimiento de la planta a través de la señalización célula-célula, la resistencia frente a plagas y patógenos al actuar como toxinas o elicitores y la detoxificación de metales pesados, mientras que los péptidos de degradación no poseen efectos pronunciados en la célula (12).

1.1. Biosíntesis de los péptidos

De una forma general, los péptidos son inicialmente traducidos como pre-propéptidos con una cadena de aproximadamente 100 aminoácidos, después continúa la escisión del péptido señal en la región N-terminal por peptidasas señal para producir propéptidos, lo cual ocurre en el retículo endoplásmico. Estos propéptidos son modificados por varias enzimas para dar lugar a péptidos maduros biológicamente funcionales, este proceso ocurre en el aparato de Golgi (13). En la Figura 1 se muestra un diagrama del procesamiento general que sufren los pre-propéptidos para dar lugar a un péptido bioactivo. Cabe mencionar que la secuencia primaria de la mayoría de los péptidos precursores posee características estructurales únicas.

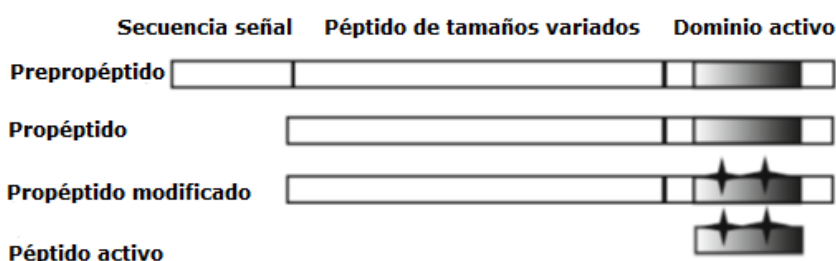


Figura 1. Procesamiento de los pre-propéptidos para generar un péptido activo (13).

1.2. Clasificación de los péptidos

Los péptidos secretados que actúan como señales pueden clasificarse en dos grandes grupos con base en sus características estructurales y a sus rutas de biosíntesis: I) Péptidos pequeños modificados post-traduccionalmente (Figura 2), los cuales, después de haber sufrido las modificaciones son sujetos a un procesamiento proteolítico y poseen un tamaño menor a 20 aminoácidos, en este grupo se encuentran la fitosulfoquina (PSK) y PSY1; y II), péptidos ricos en cisteína, se caracterizan por la presencia de un número par de residuos de cisteína (6 ó 8) que participan en la formación de puentes disulfuro intramoleculares. Entre estos se

encuentran las defensinas. De este grupo se desprende un subgrupo que se caracteriza porque los péptidos ricos en cisteína sufren procesamiento proteolítico, aún con la presencia de puentes disulfuro intramoleculares (13).

También pueden clasificarse con base a las propiedades de su secuencia N-terminal líder en; péptidos secretados y péptidos que no se secretan. La comunicación célula-célula es principalmente debida a las moléculas que se secretan. Sin embargo, hay evidencia de que las moléculas que no se secretan, pero que se liberan directamente de una célula dañada actúan como moléculas señalizadoras célula-célula en las respuestas de defensa de la planta. Y en casos raros, los péptidos que no se secretan, codificados por ORFs muy pequeños, contribuyen al desarrollo de las plantas en una manera autónoma de la célula (10). Con base en las clasificaciones anteriores, en la Figura 2 se muestra la categorización de los péptidos de señalización en términos de; su región N-terminal, estructura y sitio de acción.

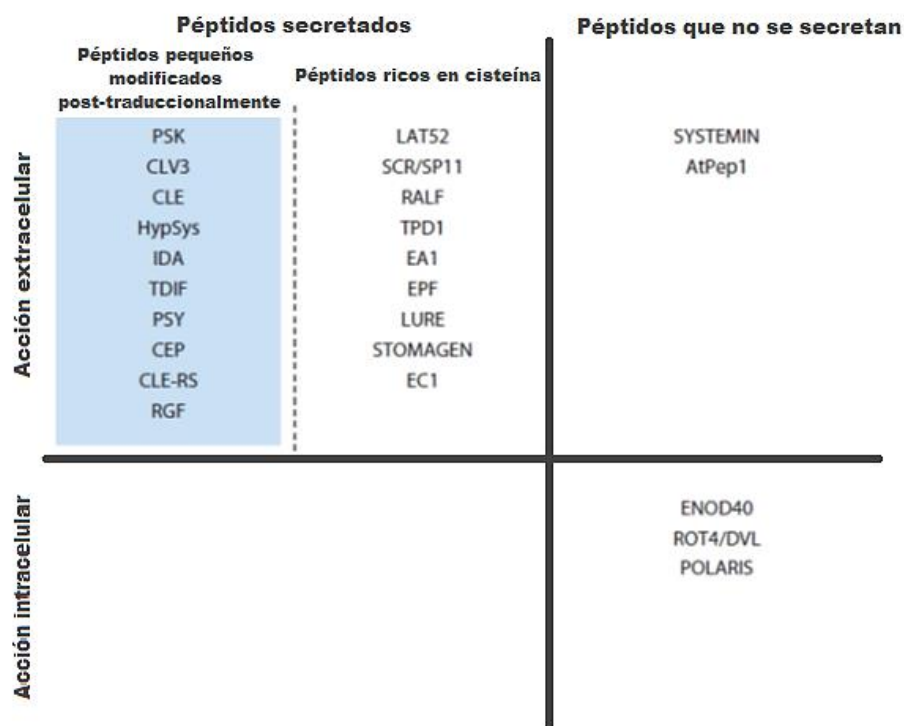


Figura 2. Categorización de los péptidos de señalización en términos de su estructura y sitio de acción (10).

Las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir los péptidos son: sulfatación de los residuos de tirosina, hidroxilación de los residuos de prolina y arabinosilación de las hidroxiprolinas. En la siguiente sección se habla

más detalladamente de cada una de ellas. En la Figura 3 se muestra un diagrama general de las modificaciones post-traduccionales, así como ejemplos de los péptidos que sufren ese tipo de procesamiento post-traduccional.

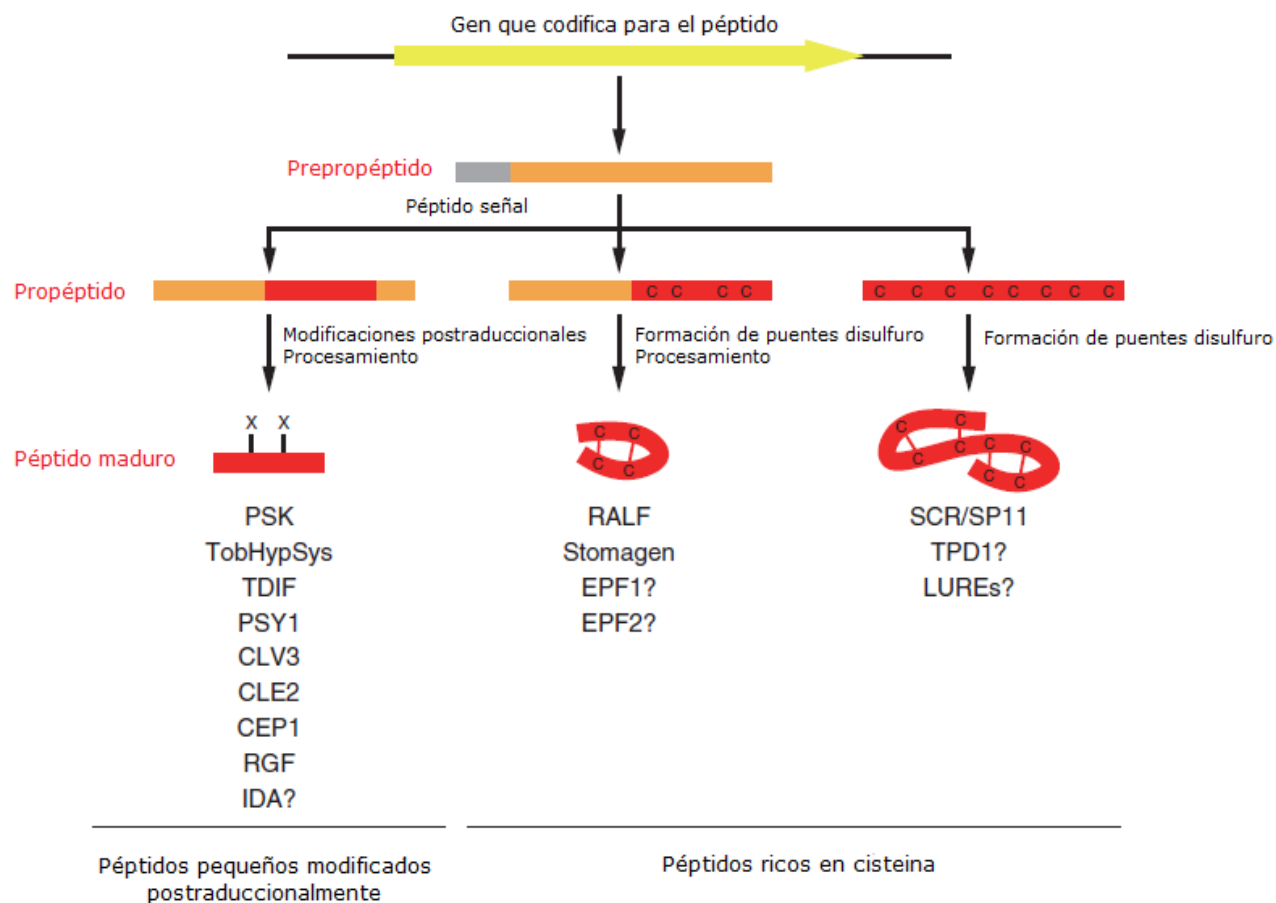


Figura 3. Diagrama que muestra las modificaciones post-traduccionales a las que son sujetos los péptidos de los dos grupos (13).

Los péptidos pequeños modificados post-traduccionalmente son un grupo característico de péptidos de señalización entre los cuales se encuentran: PSK, CLV3 y el factor de crecimiento de la raíz meristemática (RGF) (11, 13).

1.3. Modificaciones post-traduccionales

Las modificaciones post-traduccionales alteran las propiedades fisicoquímicas de los péptidos debido a la alteración de su carga neta, hidrofobicidad y/o conformación, modulando de esta manera la habilidad y la especificidad que tienen los péptidos de unirse a los receptores de sus proteínas blanco (10). Como ya se mencionó, son tres las modificaciones que sufren los péptidos. A continuación se describe cada una de ellas:

Sulfatación de los residuos de tirosina: está mediada por la enzima tirosil protein sulfotransferasa (TPST), la cual cataliza la transferencia del grupo sulfato desde el 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) al grupo fenol de la tirosina. El mínimo requerimiento que hasta la fecha se conoce para la sulfatación de las tirosinas es la presencia de un residuo de ácido aspártico adyacente a un residuo de tirosina en la región N-terminal, se denomina secuencia Asp-Tyr. Hasta la fecha se conocen solo tres péptidos en plantas que contienen tirosinas sulfatadas; PSK, PSY y RGF1 (11). La TPST de *Arabidopsis* se identificó como una proteína transmembranal de 62 kDa con una localización cis-Golgi (14). En la Figura 4, se muestra la reacción de sulfatación de los residuos de tirosina, mediados por la TPST.

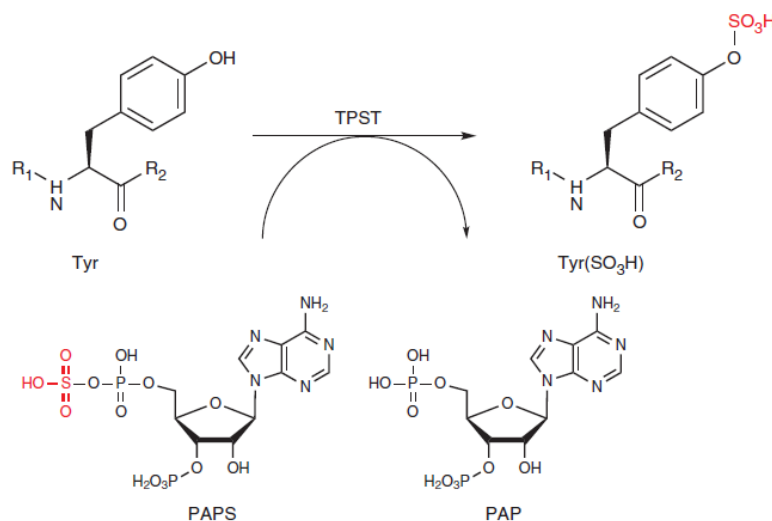


Figura 4. Reacción catalizada por la TPST para la sulfatación de los residuos de tirosina (13).

Hidroxilación de los residuos de prolina: esta reacción se lleva a cabo por la prolil-4-hidroxilasa (P4H) mediante la oxidación de los residuos de prolina exclusivamente en el carbono de la posición 4 (13), esta enzima pertenece a la familia de las dioxigenasas dependiente de 2-oxoglutarato, las cuales requieren 2-oxoglutarato y O_2 como co-

sustratos. La PH4 es una proteína transmembranal localizada en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Aún no se ha encontrado una secuencia consenso para la hidroxilación de los residuos de prolina en los péptidos secretados en plantas. Esta modificación se encuentra presente en prácticamente todos los péptidos identificados hasta el momento, excepto en la PSK que no posee residuos de prolina en su secuencia (15). En la Figura 5 se muestra el mecanismo de acción de la P4H.

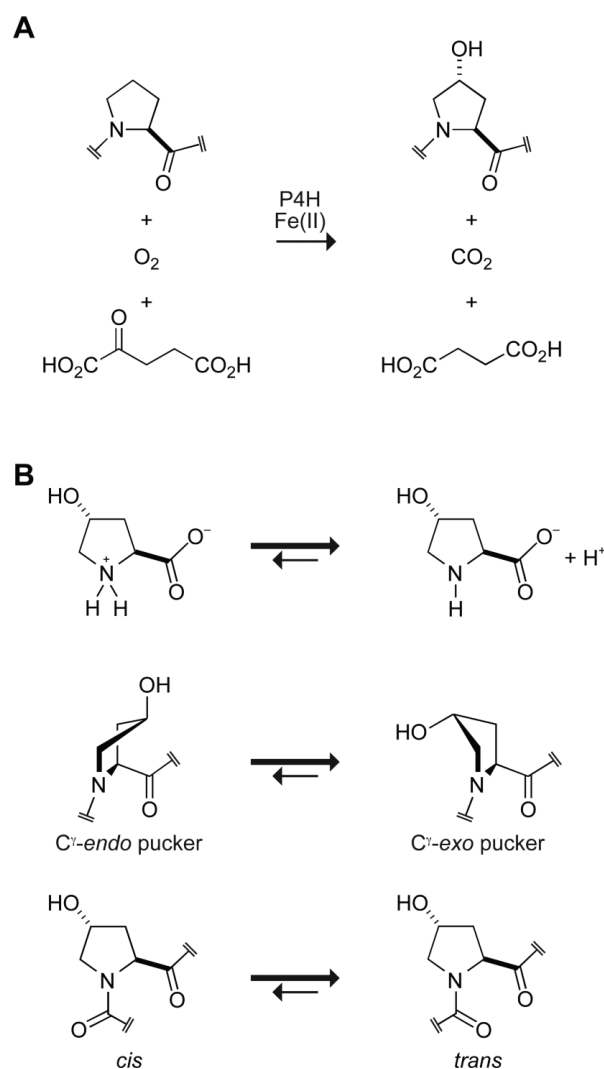


Figura 5. Mecanismo de acción de la prolil-4-hidroxilasa (P4H). (A) Reacción catalizada por la P4H. (B) El grupo 4R hidroxilo vuelve al nitrógeno prolil más ácido e incrementa la preferencia por el anillo *C γ -exo* y un enlace peptídico *trans* (16).

Arabinosilación de las hidroxiprolinas: consiste en la adición de una cadena de L-arabinosa en el oxígeno del grupo hidroxilo añadido a los residuos de prolina, la O-glicosilación ocurre por la adición sucesiva de azúcares

activados por nucleótidos y es catalizada por glicosiltransferasas en el Aparato de Golgi (13). Las uniones entre los residuos de hidroxiprolina y la arabinosa se dan vía enlaces 1,2- β , esta unión está catalizada por una arabinosiltransferasa; la hidroxiprolina O-arabinosiltransferasa (HPAT), la cual es responsable de la formación del enlace β con el O de la cuarta posición de la hidroxiprolina. También se sugiere que las enzimas GT77 y RRA3 están involucradas en la elongación de la cadena de arabinosa (17). En la Figura 6 se muestra la estructura propuesta de las uniones triarabinosa-hidroxiprolina.

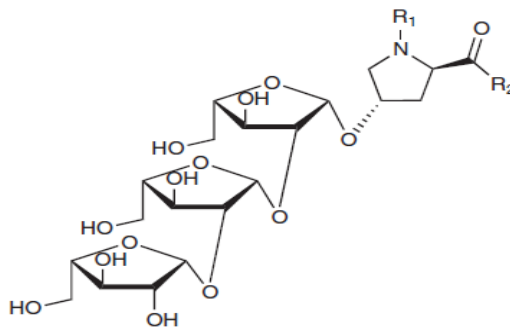


Figura 6. Estructura propuesta para los enlaces triarabinosa-hidroxiprolina, R₁ y R₂ representan cadenas peptídicas (13).

1.4. Procesamiento proteolítico

Después de que se llevó a cabo la modificación post-traduccional de los péptidos, se realiza el procesamiento proteolítico. Este procesamiento es diferente en plantas y animales, lo que los diferencia es, primero: en plantas no existe el motivo de dos amino ácidos básicos adyacentes al dominio del precursor del péptido maduro; segundo: no existe una enzima que escinda el par de aminoácidos básicos, por ejemplo en el péptido CLV3 existe una enzima que escinde una arginina en el lado amino terminal en el precursor del polipéptido, en CLE36 existe una enzima que corta entre una metionina y una serina que se localizan dos residuos arriba del dominio del péptido maduro; y tercero: una de las subtilasas de *Arabidopsis* AtSBT1.1 es responsable del procesamiento inicial de PSK4 *in vivo* pero el sitio de procesamiento es entre una leucina y una histidina localizadas por arriba del dominio del péptido maduro, lo cual indica que los sitios de procesamiento inicial no siempre definen directamente el límite del dominio del péptido maduro (10).

El procesamiento proteolítico consiste en una serie de pasos complejos que incluyen la escisión inicial endoproteolítica, seguida de un corte exoproteolítico del péptido. Cómo se reconoce el sitio final de procesamiento aún no está muy claro, una posibilidad es que el dominio del péptido maduro no sufre

procesamiento proteolítico debido a la presencia de las modificaciones post-traduccionales, las cuales a veces confieren resistencia a la digestión proteolítica (10).

1.5. Estructura y función de los péptidos pequeños modificados con sulfatación en las tirosinas

Hasta la fecha, sólo se conocen tres péptidos con tirosinas sulfatadas; PSK, PSY1 y RGF. A continuación, se describen de una forma más detallada las características de cada uno de ellos.

1.5.1. Fitosulfoquina: PSK

Desde principios de la década de los 70's se sabía que la proliferación de las células vegetales en cultivos líquidos dispersos era estrictamente dependiente de la densidad inicial de células que se inoculaban y que la actividad mitogénica en cultivos en suspensión de baja densidad no podía ser estimulada con la adición de ninguna de las hormonas en plantas conocidas hasta entonces: auxinas, citocininas, giberelinas, etileno y ácido absísico, o por la adición de nutrientes. Sin embargo, la proliferación de células vegetales en cultivos en suspensión de baja densidad sí podía ser inducida por la adición de medio condicionado obtenido a partir de cultivos celulares de rápido crecimiento (14). Lo cual fue probado en el trabajo de Stuart y Street en 1969, quienes demostraron que el crecimiento de cultivos celulares de baja densidad de *Acer pseudoplatanus* puede ser estimulado tras la adición de medio condicionado (14).

Se pensaba que este efecto era debido a la presencia de factores mitogénicos en el medio de cultivo secretados por las células, esenciales para la proliferación celular (18). Sin embargo, la naturaleza de los factores activos en los medios condicionados era desconocida, razón por la cual a partir de la década de los 80's comenzó su búsqueda. Esta búsqueda se inició en pocos sistemas como; maíz, zanahoria y *Pinus radiata*, sin embargo, no se logró el aislamiento e identificación de los factores activos o factores de medio condicionado debido a la falta de un método suficientemente rápido o sensible para monitorear la actividad de los componentes del medio condicionado a través de los pasos de purificación (18).

Fue hasta 1996 con el trabajo de Matsubayashi y Sakagami en que se logró identificar en medios condicionados de cultivos de células mesófilas de *Asparagus officinalis* a las fitosulfoquinas (PSK α y β) funcionales a bajas concentraciones 10^{-8} M a 10^{-9} M como componentes activos del medio condicionado, estos poseen una naturaleza peptídica y actividad mitogénica. Para lograrlo se desarrolló un bioensayo que utiliza cultivos en suspensión de

células individuales de espárrago obtenidas a partir de cladodios (tallos semejantes a hojas), ya que éstas no pueden dividirse eficientemente en condiciones subóptimas (18).

La fitosulfoquina es un péptido secretado de cinco aminoácidos que contiene dos residuos de tirosina sulfatados, la secuencia primaria de PSK α es: Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr-Gln, mientras que la de PSK β es Tyr(SO₃H)-Ile-Tyr(SO₃H)-Thr. Tanto la PSK α como la PSK β al ser sintetizadas químicamente mostraron actividad. Los análogos truncados en la posición N-terminal y los análogos no sulfatados, son inactivos, lo que sugiere que el tripéptido de la porción N-terminal es la parte activa. La sustitución de Ile por una Val y la del Thr por una Ser, resultó en un decremento de 20 veces su actividad. Se piensa que PSK β es un producto de degradación de PSK α , el cual ha perdido una glutamina terminal probablemente por escisión debida a una carboxipeptidasa (18).

El precursor de PSK contiene un péptido señal sulfatado en los residuos de tirosina, y es secretado al medio de cultivo, lo que sugiere que es sintetizado a través de una vía secretora. En zanahoria se identificó una proteína tirosilsulfotransferasa que sulfata al precursor de PSK antes de su secreción (19). PSK es reconocido a través de un receptor de cinasa rica en secuencias repetidas de leucina (LRR-RK por sus siglas en inglés) localizado en la membrana, denominado PSKR1 y PSKR2, este receptor contiene 21 LRR con una isla de 36 amino ácidos (13). PSK interacciona directamente con el dominio de la isla localizado entre el 17° y 18° repetido de leucina (20).

Los genes que codifican para PSK están ampliamente distribuidos en una gran variedad de tejidos, se han detectado en *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota* y *Zinnia elegans*, además de *A. officinalis*, lo que sugiere que las fitosulfoquinas se encuentran conservadas entre especies mono y dicotiledóneas (18, 21-23).

La PSK también promueve la diferenciación del elemento traqueal en células mesófilas de *Zinnia* (13,24), participa en la embriogénesis somática y en la germinación del polen en zanahoria (25), produce raíces adventicias y formación de yemas en callos de Antirrino (26) y también induce la formación de raíces adventicias en hipocótilos de pepino (27). PSK interviene en la división celular y en el desarrollo, sin embargo, aún continúa investigándose su mecanismo de acción, ruta de señalización, su relación con otras hormonas y su papel en la regulación de los procesos de desarrollo.

Se demostró que tanto PSK como sus dos receptores PSKR1/2 están involucrados en la defensa inmune en plantas (28-30). Las plantas mutantes para los receptores de PSK, exhiben una expresión aumentada de genes de defensa, así como resistencia incrementada a la bacteria biotrófica *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pto) DC300 (28), mientras que son más resistentes al hongo necrotrófico *Alternaria brasiliicola* (30). De forma paralela, las mutantes para los receptores de PSK muestran un aumento en los niveles de salicilato y represión de los genes relacionados con el ácido jasmónico. En conclusión, la señalización mediada por los receptores de PSK desplaza la homeostasis hormonal a favor de la ruta del ácido jasmónico y negativamente regula la acumulación de salicilatos. En la Figura 7 se muestra un esquema de la posible señalización mediada por PSKR1 involucrada en la respuesta

inmune en las plantas. Por último, se propone que PSK es el primer péptido identificado en plantas que suprime la respuesta inmune.

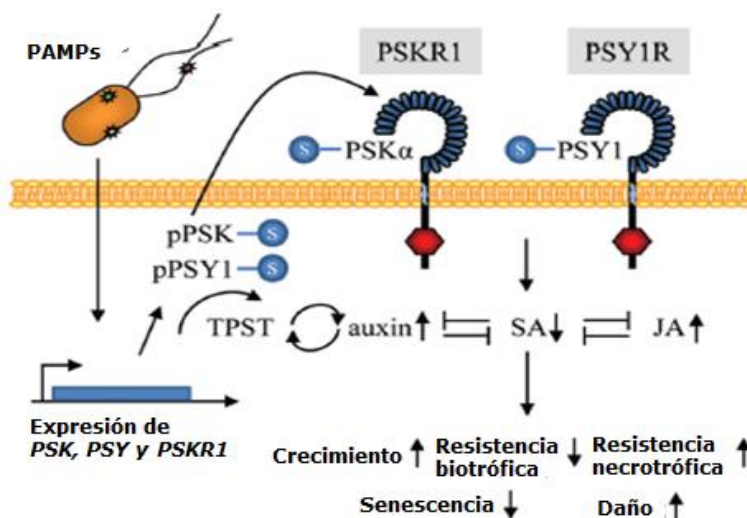


Figura 7. Señalización de los péptidos con tirosinas sulfatadas en la defensa en plantas (27). PSKR1, PSK y PSY son inducidos tras la infección con *P. syringae* pv. *tomato* y por las moléculas asociadas a patógenos (PAMPs). Las preproteínas pPSK y pPSY1 son sulfatadas por una TPST en el aparato de Golgi. Las preproteínas son procesadas proteolíticamente en el apoplasto. Los péptidos completamente procesados PSK α -S y PSY1-S se unen a sus respectivos receptores PSKR1 y PSY1R. Los receptores contienen un dominio extracelular rico en repetidos de leucina (azul), un solo dominio transmembranal (azul claro) y un dominio cinasa citosólico (rojo). La activación de esos receptores conduce a la supresión (↓) de la señalización y consecuentemente a la supresión de la resistencia a patógenos biotróficos, senescencia, así como regulación (↑) de la señalización por ácido jasmónico (JA) y de forma consecuente a la resistencia incrementada a patógenos necrotróficos y una respuesta incrementada al daño. La señalización por PSK α y PSY1 también promueve el crecimiento, el cual es dependiente de auxinas. La expresión de TPST es inducida por la señalización por auxinas y la actividad de TPST promueve la regulación de la señalización por auxinas, lo cual sugiere que las rutas de auxina y TPST están estrechamente ligadas.

1.5.2. PSY1

PSY1 es un glicopéptido secretado de 18 aminoácidos que contiene un residuo de tirosina sulfatado y tres residuos de L-Arabinosa requeridos para la actividad biológica, su secuencia de aminoácidos es: Asp-Tyr(SO₃H)-Gly-Asp-Pro-Ser-Ala-Asn-Pro-Lys-His-Asp-Pro-Gly-Val-(L-Ara₃)-Hyp-Hyp-Ser. Fue identificado en 2007 por Amano *et al* (30) tras una exhaustiva búsqueda de péptidos con tirosinas sulfatadas en cultivos vegetales de células en suspensión de *A. thaliana*. El patrón de expresión, así como la actividad biológica de PSY1 son similares a los de

PSK. PSY1 se expresa en varios tejidos de *Arabidopsis* donde promueve la proliferación y expansión celular en concentraciones nanomolares.

El reconocimiento de PSY1 está mediado a través de su receptor PSY1R el cual es un receptor de cinasas rico en repetidos de leucina (31).

Al igual que PSK, recientemente se ha encontrado que PSY1 también reprime la inducción de genes relacionados al estrés biótico, mediado por moléculas asociadas a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés) (Figura 7). La señalización a través de su receptor PSY1R desplaza la homeostasis hormonal en favor de la ruta del jasmonato y regula negativamente la acumulación y la señalización por salicilatos (28). La integración de la señalización de PSY1 en la promoción del crecimiento, en el desarrollo y en la defensa puede incluir la comunicación cruzada entre diferentes fitohormonas entre las cuales se puede incluir a las auxinas, ya que éstas han mostrado un efecto supresor de las respuestas a salicilato y viceversa. Se ha propuesto un modelo en el cual, tanto el reconocimiento de PSY1 como de PSK conduce a una baja regulación de las respuestas asociadas a salicilato después de una infección con un agente patógeno del tipo biotrófico, evitando de este modo, un exceso de inducción de esta vía de señalización en particular, que de otro modo reduciría la salud de las plantas y las dejarían vulnerables a patógenos necrotrofos, como se puede observar en la Figura 7.

1.5.3. RGF1

Este péptido fue identificado por el grupo de Matsubayashi en 2010 a través de una búsqueda de péptidos sulfatados que pudieran recuperar los defectos causados por la mutación del gen *tpst-1* en raíces meristemáticas en combinación con un screening *in silico* de genes que codificaran péptidos sulfatados y bioensayos con péptidos sintéticos sulfatados. Estas mutantes muestran un fenotipo de raíz atrofiada con una pérdida del mantenimiento de las células madre en la raíz, así como un decremento considerable en la actividad meristemática, ni PSY1 ni con PSK logran recuperar la actividad meristemática (32).

La familia de péptidos de RGF se expresa principalmente en el área de células madre y en la capa más interna de las células de la columnela y de ahí difunde a través del apoplasto hacia las regiones meristemáticas (11, 31).

Los péptidos RGF regulan el desarrollo de la raíz a través de la estabilización de la proteína PLETHORA, la cual es un factor de transcripción que se expresa específicamente en el meristemo de la raíz y media el patrón del nicho de células madre en la raíz.

RGF es un péptido de 13 amino ácidos requerido para el mantenimiento del nicho de células madre de la raíz, su secuencia de amino ácidos es la siguiente Asp-Tyr(SO₃H)-Ser-Asn-Pro-Gly-His-His-Pro-Pro-Arg-His-Asn (31).

Los péptidos en animales presentan tirosinas sulfatadas (22), sin embargo, hasta la fecha, las fitosulfoquinas PSK, PSY1 y RGF1, son el único ejemplo en plantas, de péptidos de señalización modificados post-traduccionalmente a través de la sulfatación en los residuos de tirosina.

2. Técnicas para la identificación de péptidos

2.1. Purificación guiada por bioensayos

La purificación guiada por bioensayos, consiste en un conjunto de análisis bioquímicos como el fraccionamiento en columnas de intercambio catiónico o aniónico, filtración por masa molecular, cromatografía líquida, entre otras, cuyo objetivo es el aislamiento y purificación del péptido de interés, confirmando cada paso de purificación con un bioensayo que nos permita medir la actividad biológica de interés. Con esta técnica se logró la identificación del primer péptido señal en plantas: la sistemina en tomate, el cual participa en defensa, no es secretado y no posee modificaciones post-traduccionales, sin embargo, su descubrimiento sirvió para inspirar a otros investigadores en la búsqueda de péptidos de señalización en plantas. El descubrimiento del péptido sistemina demostró la efectividad del uso de las herramientas bioquímicas, debido a que su purificación fue guiada por bioensayos. Posteriormente en 1996 con el uso de una purificación clásica guiada por bioensayos se logró identificar al péptido PSK, el cual es el primer péptido de señalización post-traduccionalmente modificado que fue identificado en plantas (10). Después en el 2001, con el de la purificación guiada por bioensayo, se logró identificar a la familia de glicopéptidos de sistemina ricos en hidroxiprolina (HypSys). Finalmente en el 2006, se identificó a través la misma técnica al Factor inhibidor de la diferenciación del elemento traqueal (TDIF), un péptido de 12 aminoácidos que regula el destino de las células madre (10).

2.2. Genética clásica

Esta técnica está limitada a genes de péptidos funcionales y no redundantes, con esta técnica en 1999, solo se logró identificar al péptido CLV3, el cual está involucrado en el mantenimiento de las células madre en el meristemo apical y al péptido de Inflorescencia deficiente en abscisión (IDA) en 2003, que regula la abscisión de los órganos (10). Sin embargo, la estructura funcional de CLV3 se elucidó más tarde con ayuda de análisis bioquímicos, mientras que la de IDA aún no ha sido determinada. Después del descubrimiento de estos dos péptidos no se han identificado más péptidos con la ayuda de la genética clásica, lo que indica que todos los genes

para péptidos no redundantes que producen un fenotipo no discernible al ser mutados han sido completamente caracterizados (11).

2.3. Bioinformática

Está técnica es la tendencia en la investigación actual con péptidos, debido a los avances en las tecnologías genómicas y transcriptómicas. Algunos de los péptidos que se han identificado mediante estas técnicas son los siguientes; la familia de péptidos CLE a través de la búsqueda de homólogos del péptido CLV3. Los péptidos de la familia CLE poseen un dominio conservado de 14 aminoácidos llamado dominio CLE en o cerca de su región carboxilo terminal. En 2007, se identificó el péptido EPF1 a través de un análisis exhaustivo de sobreexpresión de genes que pudieran codificar péptidos pequeños secretados con el uso del genoma anotado de *Arabidopsis*. En 2010, a través del acoplamiento de la búsqueda *in silico* y el uso de un bioensayo, se logró identificar a la familia de péptidos RGF los cuales, como ya se mencionó, son requeridos para el mantenimiento del nicho de células madre en la raíz. Debido a que este conjunto de técnicas supera la barrera puesta por la redundancia en los genes y/o la baja abundancia de los péptidos en los tejidos, se debe dirigir la atención hacia la búsqueda de péptidos *in silico* basados en bioinformática (10).

3. Efecto de la adición de péptidos en la producción de metabolitos secundarios

Además de su función como moléculas señalizadoras en diversas funciones del desarrollo, crecimiento y defensa de las plantas, los péptidos también pueden, directa o indirectamente, modular o elicitar el metabolismo secundario de éstas, por ejemplo, los péptidos sistemina y PIP-1 en especies de solanáceas, y Pep (péptido elicitor de plantas) en maíz, han mostrado tener un papel en la señalización de defensa en las plantas a través del ácido jasmónico (JA) o pueden elicitar la producción de fitoalexinas terpenoicas y terpenos volátiles (34-36).

Sin embargo, en las especies que se utilizaron en este trabajo, *B. ternifolia*, *T. erecta* y *T. globosa*, aún no han sido identificados péptidos pequeños de señalización. Hasta junio del 2014 solamente se había evaluado el efecto del péptido fitosulfoquina en la producción de tres metabolitos secundarios de; *Atropa belladonna*, *Taxus canadiensis* y *Taxus cuspidata* (37,38). En el caso de *A. belladonna*, se evaluó el efecto de PSK- α en el crecimiento y la producción de alcaloides tropano en raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*. Se observó un aumento en la producción de alcaloides tropano, especialmente de hiosciamina, tras la adición de 10^{-7} y 10^{-8} M

de PSK- α . Además, el contenido de alcaloides tropano en raíces transformadas con PSK- α fue 1.4 veces más alto que en las raíces no tratadas después de 4 semanas de cultivo. Sin embargo, no hubo un aumento en el peso seco o fresco del cultivo de raíces. Las curvas de crecimiento y la producción de alcaloides en las raíces transformadas de *A. belladonna* sugieren que la adición de PSK- α influencia el crecimiento de las raíces transformadas durante la fase log de la curva de crecimiento (36). En el caso de la medición del efecto de la adición de PSK- α sobre la producción de Taxol (paclitaxel) en cultivos celulares de *Taxus sp*, el efecto observado fue línea celular dependiente, la línea celular P93AF de *T. cuspidata* no mostró respuesta significativa, mientras que las líneas C93AD de *T. canadiensis* y PO93X de *T. cuspidata* mostraron un efecto dependiente de la concentración cuando se añadieron concentraciones mayores a 100 nM de PSK- α en las primeras 24 h de cultivo, con una disminución en el promedio de crecimiento inicial, un incremento en la densidad celular (peso seco / peso fresco) y un incremento en la producción de Taxol. El efecto fue más marcado con la línea C93AD de *T. canadiensis* en que se observó una fuerte respuesta sinérgica tras la adición de 100 nM de PSK- α y la elicitación con 100 mM de metil jasmonato ya que se logró un incremento en la producción de taxol de 10 veces mayor que la lograda sólo con la adición de jasmonato (37).

Posteriormente en 2014 se logró la identificación de un gen denominado Taximin, el cual codifica un péptido pequeño de señalización rico en cisteína específico de plantas, que se encuentra ampliamente conservado en las plantas superiores. Su identificación se logró a través de una búsqueda en datos de transcriptómica generados a partir de cultivos de *T. baccata* elicitados con metil jasmonato. Se observó que la expresión de Taximin incrementa de manera coordinada con los genes involucrados en la síntesis del metabolito secundario paclitaxel, también que el péptido marcado entra en la vía de secreción y co-localiza en la membrana plasmática. Al adicionar de forma externa una versión sintética del péptido activo, se pudo modular la biosíntesis de taxanos en células en suspensión (38).

4. Estudios recientes de peptidómica para la identificación de péptidos bioactivos en plantas

Recientemente se han realizado algunos estudios en que se utiliza la peptidómica para determinar el contenido de péptidos en cultivos de células en suspensión, por ejemplo, en la identificación de más de 1000 péptidos en el jugo de saúco. En este estudio se realizó una extracción en fase sólida para eliminar el contenido de antocianinas y enriquecer el contenido de péptidos, posteriormente se realizó cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para separar e identificar los péptidos, mientras que para el análisis de los

espectros y la secuenciación *de novo* de los péptidos se utilizaron los programas PEAKS y Orbitrap, respectivamente (39).

Otro estudio que se realizó fue el análisis del proteoma soluble de cultivos en suspensión celular de *A. thaliana* ecotipo Landsberg erecta como modelo y *Nicotiana tabacum* cv. "Bright Yellow-2" (BY-2) como sistema no secuenciado, en este trabajo se utilizó cromatografía de intercambio catiónico fuerte como primer paso para el enriquecimiento y separación de péptidos, seguido por un análisis de espectrometría de masas, con lo cual se pudieron identificar 13000 péptidos (40).

5. Características e importancia de las especies vegetales utilizadas

5.1. *Bouvardia ternifolia*

Bouvardia ternifolia (Cav.) Schlttdl es un arbusto común en las zonas templadas y semiáridas de México, sus datos taxonómicos son los siguientes:

Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares); Superdivisión: Spermatophyta; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida (dicotiledonéas); Subclase: Asteridae; Orden: Rubiales.

Fue usada por los indígenas mexicanos como curativo general, mientras que en la época contemporánea, se usa como un remedio para la disentería, hidrofobia y otras afecciones. Su nombre común es trompetilla. Posee un metabolito secundario denominado bouvardina, el cual es un hexapéptido cíclico con actividad antitumoral. El hexapéptido está compuesto estructuralmente por dos L-alaninas, una D-alanina, 3 N-metil-L-tirosinas modificadas y un anillo de 14 miembros formado por el acoplamiento oxidativo del oxígeno fenólico de una tirosina al carbón orto de un hidroxilo fenólico de otra tirosina adyacente (41,42). En la Figura 8 se muestra la estructura de la bouvardina.

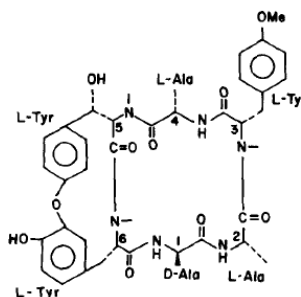


Figura 8. Estructura química de la Bouvardina.

5.2. *Tagetes erecta*

Tagetes erecta L. o cempazúchitl, su descripción taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta; Superdivisión: Spermatophyta; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Subclase: Asteridae; Orden: Asterales.

Es originaria de México y Centroamérica, es usada principalmente como planta ornamental, aunque también, la luteína, que es uno de sus carotenos, se usa como suplemento alimenticio y como colorante en la industria alimenticia. La luteína es un oxicarotenoide. Su estructura está dada por una cadena isoprenoide de 40C común en todos los carotenoides, además de dos grupos cíclicos terminales (dos anillos ionona) uno alfa y otro beta (Figura 9). Aunque, los dobles enlaces de la cadena polieno presentes pueden estar en una conformación cis o trans, dando lugar a un gran número de isómeros mono-cis y poli-cis, la gran mayoría de los carotenoides están en configuración trans. Su fórmula química es $C_{40}H_{56}O_2$ y su masa molecular es 568.88.

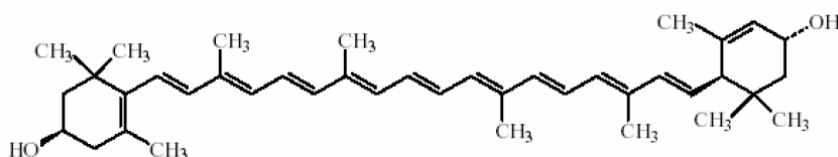


Figura 9. Estructura química de la luteína.

Diversos estudios han sugerido que el consumo diario y farmacéutico de la luteína y zeaxantina protege la macula de los ojos del daño oxidativo producido por la luz, a través de la filtración de la luz de onda corta y la disminución del riesgo de degeneración macular asociada a la edad y cataratas (43,44).

5.3. *Taxus globosa*

Taxus es un género taxonómico de la familia Taxaceae, que agrupa entre siete y doce especies del hemisferio norte; ha tenido problemas de ubicación taxonómica. Según Sporne (1974), una de las familias muy afines a Taxaceae es Podocarpaceae, a tal grado que algunos autores habían considerado a ambas en una sola familia junto con *Cephalotaxus* y *Podocarpus*. En alguna ocasión, por ejemplo, *T. globosa* fue considerada como una pinácea, denominándosele entonces *T. mexicana subsp. senilis*. No obstante, registros fósiles de *Taxus* del jurásico

(*T. jurassica*) y de especies modernas mostraron que producía óvulos terminales solitarios, por lo cual se consideró a *Taxus* y géneros afines en una sola familia, Taxaceae. Al nivel específico, también han existido problemas taxonómicos, debido a que todas las especies de *Taxus* son morfológicamente semejantes. Esto ha provocado el uso de la distribución geográfica como principal característica distintiva. Se ha propuesto que todas las especies pertenecen a *T. baccata*; así, un nombre usado para la especie mexicana, de acuerdo con esa propuesta, es *T. baccata* subsp. *globosa* (45).

Esta especie se encuentra en México y Centroamérica, está compuesta por árboles dispersos en bosque de coníferas y de hoja ancha y a lo largo de riberas y ríos. Las distintas especies de *Taxus* se usan localmente como leña, carbón o plantas de ornato pero aún son escasamente conocidos sus aspectos biológicos básicos como su ciclo reproductivo, sus mecanismos de dispersión y los agentes específicos involucrados en su dinámica poblacional. Sin embargo, es de gran interés debido al metabolito secundario que produce conocido como paclitaxel o Taxol, el cual es un diterpeno capaz de inhibir la proliferación celular, por lo que es utilizado en el tratamiento contra el cáncer de seno, ovario, pulmón y vejiga (46), en la Figura 10 se muestra la estructura química del Taxol.

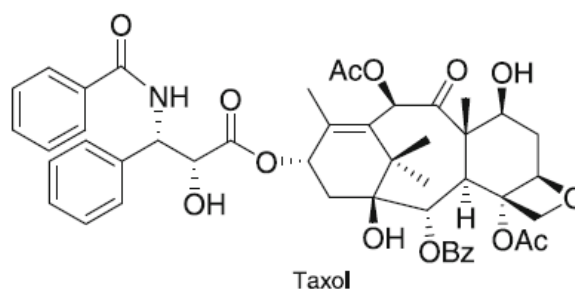


Figura 10. Estructura química del Taxol

HIPÓTESIS

Se ha demostrado que cultivos celulares de especies no productoras de metabolitos de interés industrial secretan péptidos que promueven la proliferación celular en cultivos de baja densidad. Por lo tanto, se propone que también sería posible encontrar este tipo de péptidos en los medios condicionados por células vegetales que sintetizan productos secundarios de interés industrial como son: *Bouvardia ternifolia*, *Tagetes erecta* y *Taxus globosa*.

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar péptidos bioactivos que presenten actividad mitogénica en medios condicionados obtenidos a partir de cultivos de líneas celulares de *T. erecta*, *B. ternifolia* y *T. globosa*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecimiento de cultivos en suspensión de líneas celulares de *B. ternifolia*, *T. erecta* y *T. globosa*.
- Obtención de medios condicionados (MC).
- Optimización de un bioensayo con células de cladodios de espárrago.
- Utilización del bioensayo para demostrar la presencia de factores mitogénicos en el MC.
- Determinación de la naturaleza peptídica del o los factores del MC.
- Aislamiento y purificación de los componentes peptídicos presentes en los medios condicionados que presenten actividad biológica.
- Determinación de la secuencia peptídica.
- Comprobar la actividad mitogénica de los factores peptídicos aislados en las células homólogas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Para la obtención de medios condicionados se utilizaron cultivos en suspensión de líneas celulares de: *T. erecta* (3K) *B. ternifolia* (3Bt), mientras que la parte de *T. globosa* no se trabajó con línea celular debido a la dificultad del establecimiento de líneas celulares ausentes de oxidación, por lo que se trabajó con callo heterogéneo. Para la realización del bioensayo en células de espárrago, se utilizaron cladodios de espárrago (*A. officinalis* L. variedad Mary Washington) de 40 a 60 días de edad.

2. Medios de cultivo

2.1. *Tagetes erecta*

Tanto para los medios sólidos de mantenimiento, como para los cultivos líquidos de mantenimiento y recolección del medio condicionado, se utilizó como base el medio B5, el cual se describe en la Tabla 1, además de los siguientes componentes; kinetina 1.1 mg/L, antioxidante: ácido cítrico 1 mg/L y ácido ascórbico 1 mg/L, vitamina Nich 10 mL/L, Coctel 20 (en proceso de patente) 10 mL/L, polivinilpirrolidona (PVP) P.M. 10000, P2307 de Sigma-Aldrich 1 g/L, ácido aspártico 0.1275 g/L, prolina 0.1125 g/L, glicina 0.0725 g/L, arginina 0.1750 g/L, sacarosa 30 g/L y en el caso de los cultivos sólidos se agregó el agente gelificante Gelzán a una concentración de 3.3 g/L.

Tabla 1. Composición del medio B5.

Elementos mayores (mg/L)		Elementos menores (mg/L)	
KNO ₃	2500	H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	150	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250	ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	KI	0.75
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	150	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
Na ₂ · EDTA	37.3	CuSO ₄ · 6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.030

2.2. *Bouvardia ternifolia*

El medio utilizado para el mantenimiento de callos y células en suspensión está basado en el medio MS descrito en la Tabla 2, además de los siguientes componentes; vitamina R2, glicina 2 mg/L, 2,4-D 1 mg/L, kinetina 0.05 mg/L, antioxidante: ácido cítrico 50 µg/L y ácido ascórbico 50 µg/L, sacarosa 30 g/L y en el caso de los medio sólidos se añade Gelzán 3.3 g/L.

Tabla 2. Composición del medio MS.

Elementos mayores (g/L)		Elementos menores (mg/L)	
NH ₄ NO ₃	1.65	H ₃ BO ₃	6.2
KNO ₃	1.90	MnSO ₄ · 4H ₂ O	16.9
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.44	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.37	KI	0.83
KH ₂ PO ₄	0.17	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0556	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25
Na ₂ · EDTA	0.0746	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.25

2.3. *Taxus globosa*

El medio utilizado para el mantenimiento de las células en suspensión está basado en el medio MS Tabla 2, además de los siguientes componentes; vitamina R2, glicina 2 mg/L, ANA 2mg/L, AIA 1mg/L, AIB 1 mg/L, BA 0.3 mg/L, antioxidante: ácido cítrico 0.5 mg/L y ácido ascórbico 0.5 mg/L y sacarosa 30 g/L.

2.4. Medio para bioensayo con células de espárrago

Para la realización del bioensayo, se utilizó una modificación del medio MS, el cual se describe en la Tabla 3, además de los siguientes componentes; glutamina 1.0 g/L, sacarosa 10 g/L, manitol 30 g/L y benciladenina (BA) 0.3 mg/L. El medio Stock para la realización de los bioensayos, se preparó a una concentración de 2X.

Tabla 3. Composición del medio utilizado para el bioensayo en células de espárrago

Elementos mayores (mg/L)		Elementos menores (mg/L)	
NH ₄ NO ₃	825	H ₃ BO ₃	6.2
KNO ₃	950	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
CaCl ₂ · 2H ₂ O	220	ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1233	KI	0.83
KH ₂ PO ₄	680	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
Na ₂ · EDTA	37.3	CuSO ₄ · 6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	CoSO ₄ · 7H ₂ O	0.030

3. Obtención de las líneas celulares

3.1. Líneas celulares de *T. erecta*

Para la obtención de líneas celulares, se utilizó un procedimiento mediante el cual se generó un microcallo a partir de cultivos de células en suspensión. Para lograrlo primero se estableció un cultivo de células en suspensión colocando aproximadamente 3 g de callo en 60 ml de medio de cultivo, se dejó en incubación a 80 rpm y 25 ±2°C en oscuridad, transcurrido un periodo de 2 semanas el cultivo en suspensión se filtró primero a través de una gasa acoplada a un vaso de precipitados y posteriormente se filtró en dispersores celulares de tamaño de apertura de malla de 280 µm. Una vez filtrada la suspensión celular se dividió en dos matraces a los cuales se les añadió 30 ml de medio de cultivo fresco a cada uno y se dejó incubar en las mismas condiciones iniciales. Transcurrido el tiempo de incubación (2 semanas), la suspensión celular se filtró de la misma manera, primero a través de gasa, después a través de un dispersor celular de malla 280 µm y finalmente la suspensión resultante se filtró a través de un papel Whatman No. 4 acoplado a un embudo Büchner con ayuda de vacío. El papel filtro a través del cual fue filtrada la suspensión es transferido a una caja Petri que contiene medio sólido, y éste es incubado a 25 ±2°C en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Cuando se observa el crecimiento de un microcallo de aproximadamente 2 a 3 mm de diámetro, éste es transferido a una caja Petri con el mismo medio, hasta que alcanza un tamaño aproximado de 1 cm de diámetro, momento en el cual es transferido a un frasco de mantenimiento de callo.

3.2. Líneas celulares de *B. ternifolia*

El desarrollo de las líneas celulares de *B. ternifolia* fue realizado por Katina Ortega, alumna de licenciatura del laboratorio 104. La Línea celular utilizada en este trabajo es la 3Bt.

3.3. Líneas celulares de *T. globosa*

Hasta el momento no se han podido establecer líneas celulares a partir de microcallos que no presenten oxidación, por lo cual, la parte de *T. globosa* se trabajó con callo heterogéneo.

4. Mantenimiento de callos

4.1. *Tagetes erecta*

Los callos de la línea 3K se mantienen en condiciones óptimas a través de su subcultivo cada 11 días en medio para *T. erecta* descrito en la sección de medios de cultivo, la incubación se realiza a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.



Figura 9. Callos de mantenimiento de *T. erecta* línea celular 3K.

4.2. *Bouvardia ternifolia*

Los callos de 3Bt se mantienen a través de su subcultivo cada 30 días en medio para *B. ternifolia*, descrito en la sección de medios de cultivo, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.



Figura 10. Medios de mantenimiento de *B. ternifolia* línea celular 3Bt

4.3. *Taxus globosa*

El mantenimiento de los callos se realizó por la alumna Sesangare Campos del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, laboratorio 116, Facultad de Química, UNAM. El cual se llevó a cabo de la siguiente forma; se agregaron 3 g de callo en medio sólido para *T. globosa* y se dejó en incubación durante 21 días en oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

5. Mantenimiento de células en suspensión

Para las tres especies, se añade una cantidad inicial de callo a un volumen determinado de medio de cultivo para células en suspensión de cada especie; para *T. erecta*, se agregan 3g de callo en 60 ml, para *B. ternifolia* 1 g en 60 ml, y para *T. globosa* 3 g en 30 ml. Esta suspensión se deja incubar una semana a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad y con agitación constante a 80 rpm para *B. ternifolia* y *T. erecta*, mientras que para *T. globosa* se deja 21 días.

Transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión celular se filtró a través de un dispersor celular con una malla de acero inoxidable, para el caso de *T. erecta* y *T. globosa* el tamaño de apertura de la malla fue de $280 \mu\text{m}$, mientras que para *B. ternifolia* fue de $380 \mu\text{m}$. La suspensión resultante se dividió en dos partes; una para la recolección de medio condicionado y la otra para el mantenimiento de los cultivos en suspensión. A la fracción

destinada al mantenimiento de las células en suspensión se le añadieron 30 ml de medio fresco en el caso de *T. erecta* y *B. ternifolia*, mientras que para *T. globosa* se añaden 15 mL. Las suspensiones se dejaron en incubación por una semana para *T. erecta* y *B. ternifolia*, mientras que para *T. globosa* 21 días, transcurrido el tiempo de incubación, se repitió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Los cultivos en suspensión celular solo se mantienen por un mes, es decir, solo se realizaron tres pases a partir de la suspensión resultante después de la filtración de las células dispersas provenientes del callo. Una vez transcurridos estos pases se vuelve a iniciar el establecimiento del cultivo en suspensión y se repite todo el procedimiento anterior.

6. Recolección del medio condicionado

Para las tres especies utilizadas, de la suspensión resultante después de la aclimatización de las células provenientes del callo, es decir, después de 15 días (para *B. ternifolia* y *T. erecta*) y 42 días para *T. globosa* de iniciadas las suspensiones celulares, se recolectó el medio condicionado de la siguiente manera:

- Se filtraron las suspensiones celulares con dispersores celulares de No. 50 y apertura de malla de 280 μm .
- La suspensión resultante con células finas se dividió en dos partes iguales, una de las cuales se usó para el mantenimiento del cultivo de células en suspensión y la otra se empleó para la recolección del medio condicionado.
- A la parte destinada para la recolección del medio condicionado, se dejó reposar para que las células se depositaran en el fondo de un vaso de precipitados, posteriormente se decantó el medio con cuidado de no arrastrar las células hacia un tubo de silicón (Nalgene) para centrifuga y se centrifugó a 12500 rpm durante 20 min, se colectó el sobrenadante y se descartó la pastilla, el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman No. 4 y finalmente se almacenó a -20°C .

7. Concentración del medio condicionado

Una vez separadas las células del medio condicionado (MC), éste se concentró por desecación en frío en una liofilizadora LABCONCO a -50°C hasta alcanzar una octava parte de su volumen inicial. Ya concentrado el MC, se dializó para eliminar la mayor cantidad de sales en una bolsa para diálisis Spectra/Por[®] Dialyses Membrane MWCO: 1000.

8. Extracción de proteínas del medio condicionado con el método del Fenol/Acetato de amonio-Metanol

Una vez concentrado y dializado el medio condicionado, se tomaron 5 ml de éste y se ajustó el pH a 8.8 con buffer de extracción, el cual se preparó de la siguiente manera; 100 mM tris HCl, pH 8.8, 10 mM EDTA y 0.4% de 2-betamerceptoetanol, y además se le añadieron 5 ml de fenol pH 8.8. Se dieron 5 pulsos de 1 min en el politrón alternados por 1 min en hielo, después de los 5 pulsos se mantuvieron en hielo 10 min más y se centrifugaron a 7000 rpm durante 1 h. Posteriormente, se tomó la fase orgánica (fase superior) y se depositó en un tubo de 50 ml nuevo, se agregaron 25 ml de acetato de amonio 100 mM en metanol, se agitó y se dejó reposar 16 h a -20°C . Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 7000 rpm durante 30 min para obtener una pastilla, se descartó el sobrenadante, la pastilla se lavó dos veces con 5 ml de acetato de amonio 100 mM en metanol agitando muy bien para que la pastilla se lavara exhaustivamente, después de cada lavado se centrifugó a 7000 rpm por 10 min. Posteriormente se lavó con acetona al 80% y al final se realizó un último lavado con etanol al 70%, se dejó secar la pastilla poniendo el tubo boca abajo por 10 min y después boca arriba por otros 10 min.

9. Fraccionamiento inicial con la columna DEAE Sephadex A-25

Después de la extracción con fenol, las muestras se disolvieron en 1 ml de acetato de amonio 20 mM pH 7.5 y se cargaron en una columna de 5 cm x 6 mm de DEAE Sephadex A-25 equilibrada con acetato de amonio 20 mM pH 7.5. La columna se lavó con 2 ml del mismo buffer y las muestras se eluyeron en gradiente con alícuotas de 2 ml de acetato de amonio 200, 400, 600, 800 y 1200 mM a pH 7.5.

Las fracciones se llevaron a sequedad por desecación en frío en una liofilizadora LABCONCO, La pastilla se disolvió en 2 ml de agua desionizada estéril, se determinó la cantidad de proteína presente por medio del método

del ácido bicinchonínico, se determinó la cantidad de carbohidratos por el método de fenol-ácido sulfúrico y finalmente se midió la actividad con el bioensayo de espárrago.

10. Determinación de la cantidad de proteína con el método del Ácido Bicinchonínico

La determinación de proteína se llevó a cabo en placas de 96 pozos a un volumen final de reacción de 300 μ l, con el kit QuantiPro™ BCA Assay, dejándose incubar por 2 h a 37°C. Las lecturas se realizaron a 540 nm, en un lector de placas de ELISA Biotek. Para la determinación de la cantidad de proteína, se utilizó una curva patrón de Albúmina de suero bovino (BSA) usando 0.5, 5, 10, 20 y 30 μ g de proteína (ver Anexo 1).

11. Determinación de la concentración de carbohidratos presentes en las fracciones

En un tubo de ensaye se colocó 0.1 mL muestra, 0.3 mL de solución de fenol al 5% y 1.8 mL de H₂SO₄ concentrado, éste último fue agregado rápidamente debido a que la reacción es muy exotérmica, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente para que desarrollara color, una vez a temperatura ambiente se leyeron 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 (ver Anexo 2).

12. Obtención de cladodios de espárrago

Para la obtención de cladodios de espárrago, se utilizaron semillas de espárrago Westar Seeds International Inc, variedad Mary Washington con número de lote 842 6427, éstas se dejaron en una solución de ácido giberélico 1.0 mg/l (AG₃) durante 24 h, posteriormente se germinaron en sustrato Sunshine Mix No. 3. Se regaron cada dos días y después de 40 a 60 días del inicio de la germinación, los cladodios (hojas modificadas) fueron cortados para su uso en el bioensayo, en la Figura 11 se muestra una fotografía de los cladodios de espárrago de 40 días.



Figura 11. Cladodios de espárrago de 40-60 días de edad.

13. Bioensayo con células de cladodios de espárrago

Se recolectaron cladodios de 40 a 60 días de edad, la cantidad suficiente para obtener una densidad celular inicial de 3.5×10^4 cel/ml (aproximadamente 5 g), se eligió esta densidad celular inicial debido a lo reportado en el trabajo de Matsubayashi et al 1996. Estos se desinfectaron con una disolución de etanol al 70% durante 30 segundos, posteriormente, con una disolución de hipoclorito de sodio al 0.25% durante 10 min. Transcurrido este tiempo, las células de los cladodios se liberaron con ayuda de un homogeneizador, la suspensión resultante se filtró a través de dispersores celulares de apertura de malla de $280 \mu\text{m}$, después, se centrifugó en tubos de microfuga a 1000 rpm durante 3 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en agua estéril. Se tomó una alícuota de la suspensión celular resultante y se determinó la densidad celular inicial con ayuda de la cámara de Neubauer.

Posteriormente, en placas de 24 pozos estériles se agregaron en el siguiente orden: 250 μl de medio para espárragos descrito anteriormente a una concentración de 2X, el volumen requerido de muestra de medio condicionado a probar (en el caso de los controles no se agregó nada), el volumen de la suspensión celular necesario para obtener una densidad celular inicial de 3.5×10^4 cel/ml, cloranfenicol y estreptomicina a una concentración final de $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ cada uno, y la cantidad necesaria de agua estéril para llegar a un volumen final de 500 μl .

Las placas se sellaron con parafilm para evitar evaporación y contaminación y se incubaron en oscuridad a 23-25°C a 90 rpm, durante 7 días. Transcurrido el periodo de incubación, se realizó el conteo celular en la cámara de Neubauer, en un microscopio óptico.

14. Comprobación de la naturaleza peptídica de las fracciones activas

Con el objetivo de determinar si en las fracciones que mostraron actividad la molécula responsable del incremento en la proliferación celular era de naturaleza peptídica, se realizó un ensayo en el cual se midió el efecto de la adición de una proteasa a la fracción, para lo cual, se incubaron 10 µg de proteína de la fracción activa del MC para cada especie con que se trabajó, en presencia de la proteasa de *Bacillus licheniformis* de Sigma-Aldrich No. de catálogo 068K8702 y la misma cantidad, es decir 10 µg de la proteasa de *B. licheniformis*, se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, se inactivó la proteasa mediante ebullición a 100°C durante 2 h. Las células dispersas de espárrago se incubaron por 7 días con los medios condicionados pre-tratados con la proteasa. El control consistió en inactivar 10 µg de proteasa, mediante ebullición durante 2 h y adicionarlo a 10 µg de MC original.

15. Curvas de crecimiento de *B. ternifolia*, *T. erecta* y *T. globosa*

Para la realización de la cinética y la obtención de las curvas de crecimiento de cada especie, se añadieron 3 g de callo a 60 ml del medio líquido correspondiente a *T. erecta* y *T. globosa* en matraces de 250 ml, y 1 g de callo a 60 ml de medio para *B. ternifolia* en matraces de 250 ml, se dejaron en incubación durante 15 días en oscuridad, con agitación constante a 80 rpm y a 25-27°C. Transcurrido este tiempo, la suspensión celular resultante se filtró, primero a través de una gasa y posteriormente a través de un dispersor celular con apertura de malla de 280 µm para el caso de *B. ternifolia* y *T. globosa*, mientras que *T. erecta* se filtró a través de una malla de 360 µm. Posteriormente se tomaron 30 ml de la suspensión celular resultante y se le añadieron 30 ml de medio fresco respectivo, se dejó en incubación durante otro periodo igual al descrito para cada especie en las condiciones descritas. Una vez transcurrido este periodo, la suspensión celular se filtró de la misma forma descrita arriba y se realizó la concentración del paquete celular mediante su centrifugación a 8000 rpm en tubos de teflón previamente esterilizados, una vez concentrado el paquete celular, éste se resuspendió en 30 ml de medio fresco y se tomaron diferentes alícuotas de éste para obtener los diferentes volúmenes de paquete celular iniciales, posteriormente se añadió medio fresco para un volumen final de 15 ml en matraces de 50 ml y se dejaron en incubación a 25-27°C con agitación constante a 80 rpm en oscuridad. Para la medición del paquete celular se tomaron alícuotas de 800 µl aproximadamente cada 3 días para determinar el volumen de paquete celular con ayuda de un tubo para hematocrito de Wintrobe.

16. Identificación de los componentes de las fracciones que mostraron actividad mediante la técnica de HPLC

Con el objetivo de identificar péptidos en las fracciones de medio condicionado con actividad mitogénica provenientes del fraccionamiento con las columna DEAE Sephadex A-25 (200 mM de *B. ternifolia* y *T. erecta* mientras que para el caso del MC de *T. globosa* se utilizó el medio condicionado pues ninguna de las fracciones eluídas de la columna de DEAE Sephadex A-25 indujo un incremento en la proliferación celular) se usó la técnica de HPLC de fase reversa. Cada muestra se filtró a través de una membrana de Millipore de 0.45 μm antes de pasar por la columna de HPLC, una vez filtradas, las muestras se pasaron a través una columna C8 Symetry de 3.9 x 150 mm de Waters en un equipo de HPLC de Waters, con dos bombas modelo 510 y detector UV modelo 486. Los cromatogramas fueron generados con la ayuda del programa Waters Breeze System, las condiciones de corrida se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de corrida para la separación de los componentes de los diferentes medios condicionados en la columna Symetry C8.

Fase A	Ácido Trifluoroacético 0.1% en Acetonitrilo:Agua 25:75
Fase B	Ácido Trifluoroacético 0.1% en Acetonitrilo:Agua 5:95
Temperatura	Ambiente
Método	Gradiente
Volumen de inyección	40 μl
λ de detección	220, 254 y 280 nm

El gradiente utilizado de describe en la Tabla 5. Las condiciones para la corrida se estandarizaron con ayuda de estándares de peso molecular para HPLC, HPLC PEPTIDE STANDART MIXTURE de Sigma Aldrich, con número de producto H2016, que contienen una mezcla de los péptidos enlistados en la Tabla 6.

Tabla 5. Gradiente empleado para la separación en la columna Symetry C8.

Etapa del gradiente	Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% Fase A	% Fase B
1		1.0	0	100
2	5	1.0	0	100
3	20	1.0	3	97
4	25	1.0	3	97
5	30	1.0	0	100
6	35	1.0	0	100

Tabla 6. Mezcla de péptidos contenidos en el estándar de peso molecular para HPLC.

Nombre	Secuencia	Peso molecular
G3502	GLY-TYR	232.8
V8376	VAL-TYR-VAL	379.5
M6630 Acetato de metionina encefalina	TYR-GLY-GLY-PHE-MET	573.7
L9133 Leucina encefalina	TYR-GLY-GLY-PHE-LEU	555.6
A9525 Acetato de angiotensina II	ASP-ARG-VAL-TYR-ILE-HIS-PRO-PHE	1046.2

17. Identificación del peso molecular de los componentes presentes en el medio condicionado

Para determinar la masa molecular de los componentes activos en el medio condicionado de *T. globosa*, así como en las fracciones de *T. erecta* y *B. ternifolia*, se realizó una electroforesis en geles de Tris-Tricina de 0.75 mm con una concentración final de poliacrilamida en el gel concentrador de 4%, y una concentración de poliacrilamida del 16% en el gel separador. Se cargaron 20 μ l de muestra más 5 μ l de buffer de carga 4X el cual contenía SDS al 12% m/v, mercaptoetanol al 6% v/v, glicerol al 30% m/v, azul de Coomassie G250 al 0.05%, se lleva a aforo con Tris/HCl 150 mM pH 7.0. Se inició la corrida con 20 mA constantes durante 20 min y posteriormente se incrementó la potencia a 30 mA durante aproximadamente 8 h, se usaron los marcadores de peso molecular Color Marker Ultra Low Range (M.W. 1,060 – 26,600) número de catálogo C6210 de Sigma Aldrich. En la Tabla 7 se describe la composición de los geles.

Tabla 7. Composición del gel de Tris-Tricina al 16%,

Componente	Gel separador	Gel concentrador 4%
Acrilamida/Bisacrilamida	2.02 ml	0.3 ml
Buffer de gel (Separador 3M, Concentrador 1M)	1.48 ml	0.19 ml
pH	8.9	6.8
Glicerol al 70%	0.60 ml	0
Agua	0.46 ml	1.6 ml
Persulfato de amonio al 10%	22 μ l	18 μ l
TEMED	2.2 μ l	1.8 μ l

La preparación de la solución de acrilamida/bisacrilamida, así como de los buffer para el gel separador y concentrador, y los buffer de corrida para el cátodo y el ánodo se describen a continuación.

- Acrilamida/Bisacrilamida 1x: 48g de acrilamida y 1.5g de bisacrilamida en 100 ml de agua.
- Acrilamida/Bisacrilamida 2x: 48g de acrilamida y 3.0g de bisacrilamida en 100 ml de agua
- Buffer del gel separador: Trizma base 3M y SDS al 0.3%, el pH se ajustó a 8.9 con HCl.
- Buffer del gel concentrador: Tris-HCl 1M, se ajusta el pH a 6.8.
- Buffer del cátodo 10x: Tris/Trizma base 1M, Tricina 1M, y SDS al 1%, el pH se ajustó a 8.25.
- Buffer del ánodo 10x: Tris 2.1M y el pH se ajustó a 8.9.

En el caso del buffer para el cátodo y el ánodo se utilizan a una concentración 1x. Una vez transcurrido el tiempo de corrida, los geles se fijaron con una solución de ácido acético al 10% y metanol al 50% durante 30 min, posteriormente, se lavó con agua desionizada y se tiñó durante toda la noche con azul de Coomassie coloidal G250 preparado en el laboratorio, posteriormente se lavó con agua desionizada.

La preparación de la solución de tinción azul de Coomassie coloidal se describe a continuación:

1. Se tomaron los mL de ácido fosfórico necesarios para alcanzar una concentración final de 10 % m/v
2. Se añadió al ácido fosfórico bajo agitación metanol anhidro a una concentración final de 20 % v/v
3. Se agregó la cantidad necesaria de sulfato de amonio para obtener una concentración final de 10% m/v
4. Una vez que el sulfato de amonio se disolvió, se añadió la cantidad necesaria de Coomassie Brilliant Blue G250 para obtener una concentración final de 0.12% m/v.
5. Finalmente se añadió la cantidad necesaria de agua para llevar al volumen deseado.

18. Tinción de los geles con el Método de Vorum.

Con el objetivo de realizar una tinción más sensible (0,5 a 1 ng) se empleó este método. Una vez que el gel terminó de correr en la cámara de electroforesis se procedió a realizar la tinción de los geles con el método de Vorum:

Fijación: Se preparó una solución de metanol al 50%, ácido acético al 12% y formaldehído al 0.05% de Sigma Aldrich, No. Cat. 200 001-8). El gel se dejó en esta disolución durante 2h con agitación constante y suave a temperatura ambiente.

Lavado: Una vez que transcurrió el tiempo de fijación los geles se removieron de la solución fijadora y se lavaron tres veces en lavados de 20 minutos cada uno con una solución de etanol al 35% con agitación suave y constante a temperatura ambiente.

Sensibilización: Una vez realizados los tres lavados, el gel se transfiere a una disolución de tiosulfato de sodio al 0.02% durante 5 minutos con agitación suave y constante a temperatura ambiente.

Segundo lavado: Posterior a la sensibilización, se realizó un segundo lavado con agua bidestilada, durante tres veces cada uno con una duración de 5 minutos, con agitación suave y constante. Este punto es crítico, debido a que si se excede el tiempo de lavado, el gel podría no teñirse.

Adición de la solución de plata: Terminado el segundo lavado se procedió a colocar el gel en una disolución de AgNO_3 al 0.2% y formaldehído al 0.076% durante 20 minutos con agitación suave y constante a temperatura ambiente.

Tercer lavado: Éste se llevó a cabo con agua bidestilada en dos ocasiones durante 1 minuto cada una, con agitación suave y constante, a temperatura ambiente.

Revelado: Una vez realizado el tercer lavado, el gel se coloca en una disolución de Na_2CO_3 al 6%, formaldehído al 0.05% y tiosulfato de sodio al 0.0004% con agitación suave y constante a temperatura ambiente hasta que aparezcan las bandas.

Terminación del revelado: Para terminar la reacción de revelado se agregó una disolución de metanol al 50 % y ácido acético al 12%.

19. Separación de las proteínas mediante filtración en gel

Con el objetivo de coleccionar cada una de las proteínas o péptidos por las cuales estaban compuestas las fracciones de medio condicionado, de acuerdo a los geles de Tris-Tricina, y de buscar péptidos de tamaño pequeño, debido a que con estos geles no se encontraron péptidos de tamaño pequeño, se decidió utilizar la columna de filtración en gel Bio-Gel P-10 de BIO-RAD, número de catálogo 150-4140, de tamaño de partícula medio (90-180 μm) el cual nos permite separar proteínas en el rango de 1500 a 20000 Da,

La columna que se empleó fue de las siguientes medidas 1.0 cm x 28 cm, las proteínas se eluyeron con acetato de amonio 50 mM, las fracciones se recolectaron cada 2 ml, y posteriormente se leyó su absorbancia a 280 nm, las fracciones en donde se encontraron los picos de proteína se liofilizaron para eliminar el acetato de amonio y posteriormente se estimó su actividad.

Para tener una aproximación del peso molecular de los componentes de las fracciones de los medios condicionados, se eluyeron a través de la columna de Bio-Gel P-10 por separado los estándares de peso molecular conocido, así se añadieron, 500 μl de citocromo c 2 mg/ml y posteriormente 500 μl de insulina 1mg/ml. La insulina de 4808 Da, eluyó desde los 26 hasta los 30 ml, mientras que el citocromo c de 13400 Da, desde los 10 hasta los 14 ml.

20. Ensayo de la actividad de las fracciones obtenidas a partir de la columna Bio-Gel P10

Para determinar la actividad de cada una de las proteínas/péptidos presentes en cada fracción, se realizó el bioensayo en células dispersas de espárrago, las condiciones para su realización se describen en la sección bioensayo con células de cladodios de espárrago.

21. Ensayo de la actividad de las fracciones de *T. globosa* que no se pegan a la columna de DEAE Sephadex A-25

Con el objetivo de determinar si el compuesto que incrementa la proliferación celular en el medio condicionado de *T. globosa* que no se retenía en la columna de DEAE Sephadex A-25 se encontraba en las fracciones de lavado o en la fracción 20 mM de acetato de amonio, se le realizó el bioensayo en las células dispersas de espárrago a estas fracciones. El procedimiento para su realización se describe en el apartado

Bioensayo con células de cladodios de espárrago. La cantidad de proteína que se utiliza de cada fracción para cada pozo fue de 1 µg.

22. Fraccionamiento con la columna Superdex Peptide 10/300 GL.

Este fraccionamiento se realizó con dos propósitos, el primero fue seguir purificando, es decir, tener una mejor separación de los péptidos y proteínas presentes en las fracciones eluidas de la columna de DEAE Sephadex A-25 que mostraron actividad en las especies de *B. ternifolia* y *T. erecta*. El segundo fue fraccionar el medio condicionado de *T. globosa* con el objetivo de encontrar una fracción que mostrara actividad con el incremento de la proliferación celular, ya que, a partir del fraccionamiento de este medio condicionado a través de la columna de DEAE Sephadex A-25 y BioGel P-10 en ninguna de las fracciones se encontró actividad semejante a la encontrada en el medio condicionado total.

La columna de Superdex Peptide 10/300 GL de General Electric, es una columna pre-empacada de filtración en gel que permite una separación de alto rendimiento, es decir una separación rápida y con alta resolución de péptidos con peso molecular entre 100 y 7000 Da, con un límite de exclusión de 20 kDa.

Las condiciones para la separación fueron las siguientes; las dimensiones de la columna Superdex Peptide 10/300 GL fueron 10 x 310 mm, con un volumen de columna de 24 ml, se llevó a cabo un lavado previo de la columna con metanol, se equilibró con la fase móvil acetonitrilo 30%, TFA 0.1% en agua a una velocidad de flujo de 0.1 ml/min hasta completar dos volúmenes de columna. Una vez equilibrada la columna se procedió con la inyección de la muestra a un volumen de 500 µl (prot) y se llevó a cabo la elución de forma isocrática a 0.5 ml/min hasta completar dos volúmenes de columna, los picos se detectaron a 214 y 280 nm.

En el caso del medio condicionado de *T. globosa*, a partir de 70 ml de medio condicionado, éste fue liofilizado para reducir su volumen hasta 9 ml, posteriormente se dializó con la membrana de diálisis Spectra/Por® Dialyses Membrane MWCO: 1000. Una vez dializado, se tomó una alícuota de 500 µl y se filtró a través de una membrana de 0.45 µm, posteriormente se concentró mediante liofilización a un volumen de 150 µl, y finalmente se llevó a un volumen de 500 µl con acetonitrilo 30%, TFA 0.1% en agua para ser inyectado en la columna de Superdex Peptide 10/300 GL.

En el caso de las fracciones de 200 mM de acetato de amonio eluidas de la columna de DEAE Sephadex A-25 de las especies de *B. ternifolia* y *T. erecta*, se tomó la cantidad necesaria de fracción para inyectar a la columna 1 mg de proteína en 500 µl, como el volumen requerido de la fracción excedía los 500 µl, las muestras tuvieron que ser liofilizadas para disminuir el volumen y poder inyectarlas en la columna (Como se mencionó anteriormente, el

acetato de amonio de estas fracciones se eliminó con ayuda de liofilización y la pastilla resultante se disolvió en 1 mL de agua desionizada estéril).

23. Eliminación de la fase móvil de las fracciones eluídas de la columna Superdex Peptide 10/300 GL

Para la eliminación del acetonitrilo al 30% y el TFA 0.1% de las fracciones se utilizó un rotaevaporador, las condiciones de evaporación fueron: 60 °C, 170 mBar iniciales seguidos por 100 mBar y finalmente 70 mBar. Con rotación constante a 60 rpm. Una vez eliminados los disolventes, se resuspendieron las fracciones en 1ml de agua desionizada estéril y se les determinó el contenido de proteína por medio del método del ácido bicinchonínico descrito previamente.

24. Bioensayo con las fracciones eluídas de la columna Superdex Peptide 10/300 GL

Para determinar cuál de las fracciones eluídas de la columna Superdex Peptide 10/300 GL presentaba actividad al incrementar la proliferación celular, se utilizaron tres bioensayos; el primero se realizó en células dispersas de espárrago y se midió el incremento en el número de células, el segundo y tercero se realizaron en cultivos en suspensión celular de las especies en donde se extrajo el medio condicionado y se midió por una parte el incremento en el volumen de paquete celular (PCV) y por otro lado el incremento en el peso seco.

24.1. Bioensayo en células dispersas de espárrago; incremento del número de células

A cada uno de los picos obtenidos de la columna Superdex Peptide 10/300 GL que presentan absorción a 214 nm de las tres especies, se les realizó el bioensayo en células dispersas de espárrago con el propósito de determinar si alguna de ellas producía un incremento en el número de células de espárrago. El procedimiento que se llevó a cabo se describe previamente en la sección Bioensayo en células dispersas de espárrago, la cantidad de proteína que se añadió de cada fracción fue de 1 µg, cada fracción se ensayó por triplicado.

24.2. Bioensayo en cultivos en suspensión celular de la especie de donde se extrajo el MC; incremento del PCV

El objetivo de este bioensayo fue medir indirectamente el incremento en la proliferación celular de acuerdo al aumento en el volumen del paquete celular en los cultivos en suspensión de donde se extrajo el medio condicionado de las tres especies con que se trabajó.

Se realizó cada medición por triplicado, la cantidad de muestra que se empleó fue de 1 µg de proteína determinada por el método del ácido bicinchonínico, se inició con la densidad celular más baja que permita el crecimiento de las células en suspensión, determinada con la curva de densidad celular. Se describe la metodología a más detalle a continuación.

24.2.1. *T. erecta*

Se añadieron a 60 ml del medio para *T. erecta* 3 g de callo, se dejó incubar por 2 semanas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad y con agitación constante (80 rpm) y transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión celular se filtró por un dispersor celular con una malla de acero inoxidable de tamaño de apertura de 380 µm y la suspensión resultante se dividió en dos partes, a cada una de ellas se les añadió 30 ml de medio fresco y se dejó incubar por una semana más. Transcurrido este tiempo, las suspensiones celulares se filtraron a través de un dispersor celular con apertura de 380 µm, posteriormente éstas se centrifugaron a 8000 rpm en tubos de teflón estériles, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 30 ml de medio fresco para *T. erecta*. Se determinó el volumen de paquete celular (VPC) con ayuda de un tubo de Wintrobe. En matraces Erlenmeyer de 50 ml se añadió el volumen necesario de esta suspensión celular para obtener un volumen de paquete celular de 0.2 cm, se añadió además cefotaxima a una concentración de 1 mg/µl, y el volumen necesario de cada uno de los picos eluidos de la columna de Superdex Peptide 10/300 GL equivalente a 1µg de proteína, se llevó a un volumen final de 15 ml con medio fresco. Las suspensiones celulares se dejaron incubar a 27 - 28 °C en oscuridad, con agitación constante a 80 rpm y se determinó el VPC a los 5, 10, 15, 20 y 25 días.

24.2.2. *B. ternifolia*

Se añadió 1 g de callo a 60 ml de medio líquido para *B. ternifolia*, descrito previamente, se dejó en incubación por 15 días en oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y con agitación constante a 80 rpm, transcurrido este periodo, la suspensión se filtró a través de dispersores celulares con una malla de acero inoxidable de apertura de 280 µm y la suspensión

celular resultante se dividió en dos partes iguales, a cada una se le añadieron 30 ml de medio fresco para *B. ternifolia*, y se incubó por dos semanas en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, las suspensiones celulares se filtraron a través de un dispersor celular con apertura de 280 μm , posteriormente éstas se centrifugaron a 8000 rpm en tubos de teflón estériles, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 ml de medio fresco para *B. ternifolia*. Se determinó el volumen de paquete celular (VPC) con ayuda del tubo de Wintrobe. En matraces Erlenmeyer de 50 ml se añadió el volumen necesario de esta suspensión celular para obtener un volumen de paquete celular de 0.18 cm, se añadió además cefotaxima a una concentración de 1mg/ μl , y el volumen necesario de cada uno de los picos eluidos de la columna de Superdex Peptide 10/300 GL equivalente a 1 μg de proteína, y finalmente se llevó a un volumen final de 15 ml con medio fresco. Las suspensiones celulares se dejaron incubar a 30 °C en oscuridad, con agitación constante a 80 rpm y se determinó el VPC a los 5, 10, 15, 20 y 23 días.

24.2.3. *T. globosa*

Se añadieron 3 g de callo a 30 ml de medio líquido para *T. globosa*, se dejó en incubación durante 21 días en agitación constante a 80 rpm, en oscuridad a 30 °C. Una vez que transcurrió este periodo de tiempo, la suspensión celular se filtró a través de un dispersor celular con número de malla 5 y apertura de 280 μm , la suspensión resultante se dividió en dos partes iguales las cuales se transfirieron a matraces de 125 ml, se les agregó 15 ml de medio fresco y se dejaron en incubación durante otros 21 días más. Una vez que se cumplió el tiempo, la suspensión celular se filtró a través de un dispersor celular de apertura de malla de 280 μm , la suspensión celular resultante se concentró por medio de centrifugación a 8000 rpm en tubos de teflón estériles, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 30 ml de medio fresco para *T. globosa*, posteriormente se determinó el VPC en un tubo de Wintrobe. En matraces Erlenmeyer de 50 ml se añadió el volumen necesario de esta suspensión celular para obtener un volumen de paquete celular de 0.15 cm, se añadió además cefotaxima a una concentración de 1mg/ μl , y el volumen necesario de cada uno de los picos eluidos de la columna de Superdex Peptide 10/300 GL equivalente a 1 μg de proteína, se llevó a un volumen final de 15 ml con medio fresco. Las suspensiones celulares se dejaron incubar a 30 °C en oscuridad, con agitación constante a 80 rpm y se determinó el VPC a los 5, 10, 15, 20 y 25 días.

24.3. Bioensayo en cultivos en suspensión celular de la especie de donde se extrajo el MC; incremento del peso seco

El objetivo de este bioensayo fue medir el incremento en la proliferación celular de acuerdo al aumento en el peso seco de los cultivos en suspensión celular de donde se extrajo el medio condicionado de las tres especies con que se trabajó.

Se realizó cada medición por triplicado, la cantidad de muestra que se empleó fue de 1 µg de proteína determinada por el método del ácido bicinchonínico, se inició con la densidad celular más baja que permita el crecimiento de las células en suspensión, determinada con la curva de densidad celular (Anexo 3). Se describe la metodología a más detalle a continuación.

24.3.1. *T. erecta*

Se añadieron a 60 ml del medio para *T. erecta* 2g de callo, se dejó incubar por 15 días a 27 - 28°C en oscuridad y con agitación constante (80 rpm), transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión celular se filtró a través de un dispersor celular con una malla de acero inoxidable de tamaño de apertura 280 µm y la suspensión resultante se dividió en dos partes, a cada una de ellas se les añadió 30 ml de medio fresco y se dejó incubar por 15 días más. Transcurrido este tiempo, las suspensiones celulares se filtraron a través de un dispersor celular con apertura de 280 µm, posteriormente éstas se centrifugaron a 8000 rpm en tubos de teflón estériles, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 15 ml de medio fresco para *T. erecta*. Se determinó el volumen de paquete celular (VPC) con un tubo de Wintrobe. En matraces Erlenmeyer de 50 ml se añadió el volumen necesario de esta suspensión celular para obtener un volumen de paquete celular de 0.2 cm, se añadió además cefotaxima a una concentración de 1 mg/µl, y el volumen necesario de cada uno de los picos eluidos de la columna de Superdex Peptide 10/300 GL equivalente a 1 µg de proteína, y finalmente se llevó a un volumen final de 15 ml con medio fresco. Las suspensiones celulares se dejaron incubar a 27 - 28 °C en oscuridad, con agitación constante a 80 rpm y durante 23 días, tiempo en el cual se determinó el peso seco.

Para determinar el peso seco inicial, se filtraron tres suspensiones celulares control a través de papel filtro Whatman No. 4 (previamente pesado) éste se dejó secar en una estufa de vacío a 60°C durante 48 horas, posteriormente se volvió a pesar el papel con las células y se determinó por diferencia, el peso seco inicial de células en el bioensayo.

Para determinar el peso seco final después de 23 días de incubación, la suspensión celular se filtró a través de papel filtro Whatman No. 4 (el cual fue previamente pesado), el papel filtro con las células se dejó secar en una estufa de vacío a 60°C durante 48 horas, posteriormente, se pesó el papel con las células y se determina por diferencia, el peso del paquete celular a los 23 días.

24.3.2. *B. ternifolia*

Se añadió 1 g de callo a 60 ml de medio líquido para *B. ternifolia*, se dejó en incubación por 15 días en oscuridad a 27 – 28°C y con agitación constante a 80 rpm, transcurrido este periodo, la suspensión se filtró a través de un dispersor celular con una malla de acero inoxidable de apertura de 280 µm y la suspensión celular resultante se dividió en dos partes iguales, a cada una se le añadieron 30 ml de medio fresco para *B. ternifolia*, se incubó por 15 días más en las mismas condiciones.

Transcurrido este tiempo, las suspensiones celulares se filtraron a través de un dispersor celular con apertura de malla de 280 µm, posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm en tubos de teflón estériles, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 30 ml de medio fresco para *B. ternifolia*. Se determinó el volumen de paquete celular (VPC) en el tubo de Wintrobe. En matraces Erlenmeyer de 50 ml se añadió el volumen necesario de esta suspensión celular para obtener un volumen de paquete celular de 0.18 cm, se añadió además cefotaxima a una concentración de 1 mg/ml, y el volumen necesario de cada uno de los picos eluidos de la columna de Superdex Peptide 10/300 GL equivalente a 1 µg de proteína, y finalmente se llevó a un volumen final de 15 ml con medio fresco. Las suspensiones celulares se dejaron incubar a 25 ± 2 °C en oscuridad, con agitación constante a 80 rpm y durante 23 días, tiempo en el cual se determinó el peso seco. Para determinar el peso seco inicial, se filtraron tres suspensiones celulares control a través de papel Whatman No. 4 (previamente pesado) éste se dejó secar en una estufa de vacío a 60°C durante 48 horas, posteriormente se volvió a pesar el papel con las células y se determinó por diferencia el peso seco inicial de células en el bioensayo.

Para determinar el peso seco de las suspensiones a los 23 días de incubación, estas se filtraron a través de papel Whatman No. 4 (previamente pesado), el papel con las células se dejó secar en una estufa de vacío a 60°C durante 48 horas, transcurrido este tiempo, se pesó el papel con las células y se determinó por diferencia de peso, el peso seco de las suspensiones a los 23 días.

24.3.3. *T. globosa*

Se añadieron 3 g de callo a 30 ml de medio líquido para *T. globosa*, se dejó en incubación durante 21 días en agitación constante a 80 rpm, en oscuridad a 27 °C. Una vez que transcurrió este periodo de tiempo, la suspensión celular se filtró a través de un dispersor celular con número de malla 5 y apertura de 280 µm, la suspensión resultante se dividió en dos partes iguales, las cuales se transfirieron a matraces de 125 ml, se les agregó 15 ml de medio fresco y se dejaron en incubación en las mismas condiciones durante otros 21 días más.

Una vez que se cumplió el tiempo, la suspensión celular se filtró a través de un dispersor celular de apertura de malla de 280 µm, la suspensión celular resultante se concentró por medio de centrifugación a 8000 rpm en tubos de teflón estériles, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 30 ml de medio fresco para *T. globosa*, posteriormente se determinó el VPC con un tubo de Wintrobe. En matraces Erlenmeyer de 50 ml se añadió el volumen necesario de esta suspensión celular para obtener un volumen de paquete celular de 0.15 cm, se añadió además cefotaxima a una concentración de 1mg/ml, y el volumen necesario de cada uno de los picos eluidos de la columna de Superdex Peptide 10/300 GL equivalente a 1µg de proteína, y finalmente se llevó a un volumen final de 15 ml con medio fresco. Las suspensiones celulares se dejaron incubar a 25 - 28 °C en oscuridad, con agitación constante a 80 rpm y durante 23 días, tiempo en el cual se determinó el peso seco.

Para determinar el peso seco inicial en el cual se inició la incubación, se filtraron tres suspensiones celulares control a través de papel Whatman No. 4 (previamente pesado) éste se dejó secar en una estufa de vacío a 60°C durante 48 horas, posteriormente se volvió a pesar el papel con las células y se determinó por diferencia el peso seco inicial de células en el bioensayo.

Para determinar el peso seco final después de 23 días de incubación, la suspensión celular se filtró a través de papel filtro Whatman No. 4 (el cual fue previamente pesado), el papel filtro con las células se dejó secar en una estufa de vacío a 60°C durante 48 horas, posteriormente, se pesó el papel con las células y se determinó por diferencia el peso seco del paquete celular a los 23 días.

25. Determinación de la secuencia de aminoácidos

Con el propósito de determinar la secuencia de aminoácidos y el peso molecular exacto de los péptidos presentes en los picos eluidos de la columna de Superdex Peptide 10/300 GL que mostraron incrementar la proliferación celular, éstos se mandaron a analizar en la unidad BIOUSAI de la Facultad de Química, con la técnica de HPLC-MS (Ver Anexo 4).

RESULTADOS

1. Medición de la actividad mitogénica de los MC totales en las células dispersas de espárrago

Con el objetivo de conocer si los medios condicionados totales, que solo habían sido concentrados mediante liofilización hasta 1/8 de sus volúmenes iniciales y dializados, presentaban actividad mitogénica, se realizó el bioensayo en células dispersas de espárrago, para lo cual se añadieron alícuotas de 15, 30, 50 y 100 μ l de cada medio condicionado, que corresponde a 3.0, 6.0, 10.0 y 20.0 % (v/v). Los resultados obtenidos indican que los MC de las tres especies incrementan la proliferación celular en espárrago y que el incremento en ésta depende de la concentración de MC en que se incuban las células (Figura 12).

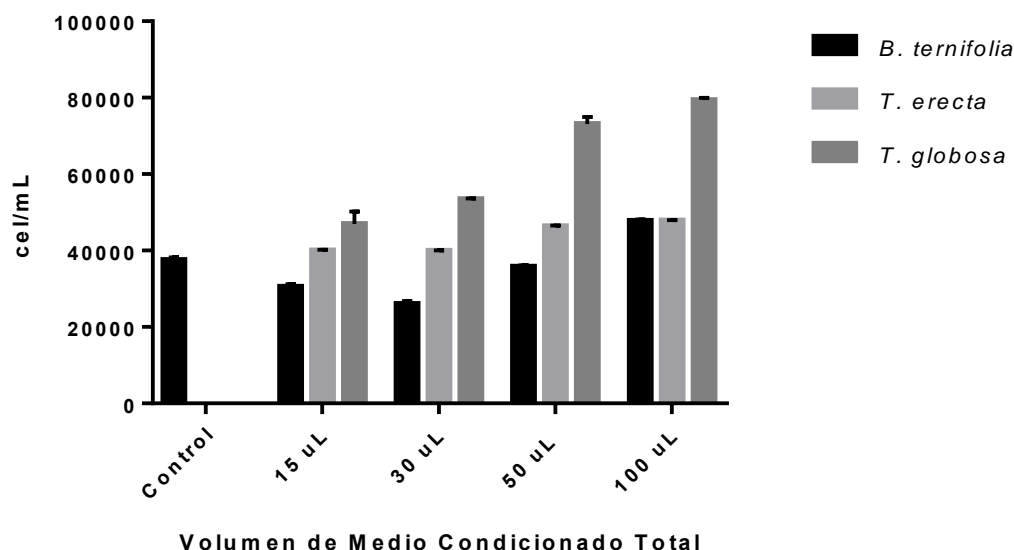


Figura 12. Incremento en la proliferación celular causado por la adición de alícuotas crecientes del MC total de *B. ternifolia*, *T. erecta* y *T. globosa* a las células dispersas de espárrago después de 7 días de incubación. La densidad celular inicial para todos los casos fue de 3.5×10^4 cel/ml. El control usado son células dispersas de espárrago a una densidad inicial de 3.5×10^4 cel/ml en medio para células de espárrago.

Además se puede observar que el medio condicionado que induce una mayor proliferación celular es el de *T. globosa*. El máximo efecto de actividad mitogénica se observó a 20 % de MC a los cultivos de células aisladas de espárrago. Aunque, el incremento en el número de células fue menor e igual para *T. erecta* y *B. ternifolia* (1.4 X) mientras que para *T. globosa* fue un poco mayor (2.2X) con respecto al control (células dispersas de espárrago).

Los cultivos de células aisladas de espárrago a las que no se les adicionó MC mantuvieron la misma densidad celular, es decir, no hubo proliferación celular. Este resultado concuerda con lo reportado en la literatura, la densidad celular óptima para que las células vegetales se dividan en cultivo es de 10^5 cels/ml (17) y en el experimento reportado en la Figura 12 fue de solo 3.5×10^4 cels /ml.

Los resultados anteriores sugieren la presencia de un factor mitogénico en el MC de los diversos cultivos ya que su adición al cultivo incrementó la densidad celular del mismo. Este factor presentó estabilidad al congelamiento, durante la liofilización, y su abundancia, su efectividad, o ambas, fueron mayores en el MC de *T. globosa* que en *B. ternifolia* y *T. erecta*. Considerando que la abundancia del posible factor mitogénico, presente en el MC, dependiera de la concentración celular, la primera propuesta, -sin descartar la segunda podría ser apoyada por el hecho de que la densidad celular de los cultivos iniciales en suspensión fue diferente. Siendo tres veces mayor para *T. globosa* (6 g de callo en 60 ml) que para *T. erecta* (2 g de callo en 60 ml) y seis veces cuando se compara con *B. ternifolia* (1 g de callo de 60 ml) con lo cual la concentración del posible factor mitogénico sería mucho mayor para *T. globosa* que para los otros dos cultivos. Sin embargo, la efectividad mitogénica de los factores en las células de espárrago no fue proporcional a la posible concentración del factor, ya que el MC de *T. globosa* logró incrementar 2.2 veces la densidad de células de espárrago, mientras que el posible factor presente en el MC de *T. erecta* y de *B. ternifolia*, la densidad solo se incrementó 1.4 veces.

2. Medición de la actividad mitogénica de las fracciones de MC eluidas de la columna Sephadex A-25 en las células dispersas de espárrago

Con el objetivo de iniciar la purificación de los componentes presentes en los MC responsables del incremento en la proliferación de las células dispersas de espárrago, se continuó con el fraccionamiento de los MC en una columna de DEAE Sephadex A-25, ésta es una columna de intercambio aniónico, que retiene péptidos ácidos con una masa molecular menor o igual a 25 kD. Cada una de las fracciones eluidas se llevó a sequedad por desecación en frío y se resuspendió en 1 ml de agua desionizada estéril. Finalmente de esta última disolución se tomaron alícuotas de 15, 30 y 50 μ l para realizar el ensayo de su actividad biológica sobre las células dispersas de espárrago, en las secciones siguientes se describen los resultados obtenidos en el incremento de la proliferación celular para las fracciones de medio condicionado de cada una de las especies.

En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las fracciones obtenidas del MC de *B. ternifolia* tras el fraccionamiento con la columna DEAE Sephadex A-25. Con excepción de la fracción eluida con 1.2 M de acetato de amonio, las otras fracciones indujeron la proliferación celular. Llama la atención que todas las

fracciones presentan cierta actividad proliferativa y en la adición de 50 μ l que equivaldría a una concentración de 10 % (v/v) la densidad celular aumentó en 1.7x respecto del control, la cual es ligeramente mayor que la obtenida con el MC total y a una concentración de 20 % (v/v). Este pequeño incremento en la actividad proliferativa observada en la fracción 200 mM de acetato de amonio respecto a la presentada en el MC total podría deberse a que el medio condicionado de esta especie contiene más de un factor proliferativo y cada uno de ellos posee diferente eficiencia proliferativa, incluida una fracción aparentemente inhibitoria (fracción eluída con 800mM de acetato de amonio, 10 % v/v). Debido a que la fracción eluída con 200mM de acetato de amonio fue la que presentó mayor actividad proliferativa se continuó con su posterior purificación (Figura 13).

Para el caso de *T. erecta*, al igual que en el fraccionamiento del MC de *B. ternifolia*, se observa que la fracción de 200 mM (Figura 13A) es la que induce una mayor actividad mitogénica. Pero a diferencia de la especie anterior, el incremento en la concentración de la fracción en el bioensayo disminuyó la actividad proliferativa respecto a la menor concentración. La actividad proliferativa de la fracción 200 mM es de 2.4x cuando la concentración de la fracción en el bioensayo es de 3 %, pero la actividad proliferativa solo se incrementó en 1.4x al hacer el bioensayo con una concentración de 10 % de dicha fracción. Este comportamiento se observó en el resto de las fracciones. Por lo que en los experimentos posteriores de purificación se utilizará solo esta fracción.

Para el fraccionamiento del MC de *T. globosa* en la columna DEAE Sephadex A-25, se puede notar que tras la extracción de proteínas seguida del fraccionamiento, el MC perdió su actividad mitogénica, ya que ninguna de las fracciones eluidas de la columna presentó actividad, por lo cual, se realizó el bioensayo a las fracciones de lavado de la columna, para ver si alguna de ellas presentaba actividad. Desafortunadamente en ninguna de las fracciones se encontró actividad. Los resultados anteriores podrían deberse a que los factores proliferativos eran de naturaleza básica y no se pegaron a la columna. Sin embargo, en la fracción que no se pegó a la columna tampoco se pudo detectar actividad mitogénica. Una probabilidad es que los factores se hubiesen diluido y su concentración ya no fuese suficiente para detectar dicha actividad. Aunque esta posibilidad no parece plausible dado que el medio condicionado total de *T. globosa* indujo un gran aumento en la densidad celular (2.2x) y por el contrario, al fraccionar el medio condicionado, en ninguna de las fracciones se observó dicho efecto. En la Figura 13D se pueden observar los resultados obtenidos tras la realización del bioensayo con las fracciones de lavado. Lo que se puede observar es que ninguna de las fracciones ensayadas produce un incremento significativo en la proliferación celular en comparación con el control, con lo cual podemos concluir que el compuesto responsable del incremento de la proliferación celular en el medio condicionado total se perdió al momento de realizar la extracción de proteínas.

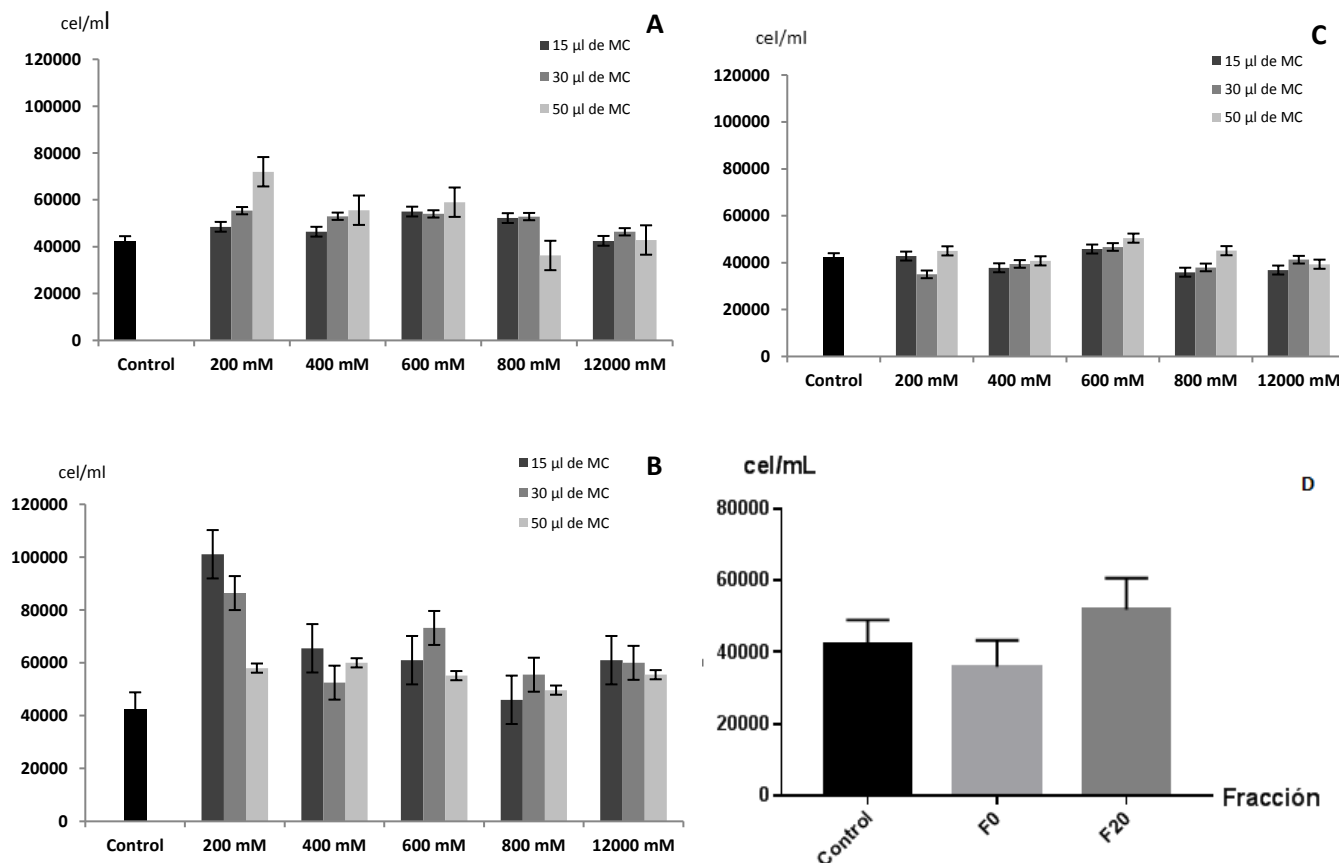


Figura 13. Actividad mitógena de las fracciones eluidas de la columna de DEAE Sephadex A-25 en las células dispersas de espárrago. **A.** MC. *B. ternifolia*. **B.** MC *T. erecta*. **C.** MC *T. globosa*. **D.** Fracciones del medio condicionado *T. globosa* que no se pegan a la columna de DEAE Sephadex A-25. F0 representa la fracción que no se pega a la columna (la cantidad de proteína que se utilizó para los bioensayos fue de 1 µg)

3. Comprobación de la naturaleza peptídica de los componentes que incrementan la proliferación celular en los Medios Condicionados

Se ha reportado el aislamiento de dos péptidos de MC que incrementaron la proliferación de células aisladas de espárrago: fitosulfokina en espárrago y PSY en arabidopsis (8 y 21). Por lo cual, se hicieron experimentos para

identificar si la naturaleza química de los factores de proliferación en nuestro sistema con las tres especies estudiadas era también de naturaleza peptídica. Con este fin se realizó el bioensayo en las células de espárrago a las fracciones que presentaron actividad mitogénica (en el caso del medio condicionado de *T. globosa* se utilizó el MC total ya que ninguna de las fracciones mostró actividad) sometiéndolas a un tratamiento previo con la proteasa de *B. licheniformis*, de esta manera, si el compuesto responsable del incremento en la proliferación celular era un péptido o una proteína, al ser inactivado por la proteasa, perdería su actividad, no mostrando incremento en la proliferación celular o una disminución en la proliferación celular en comparación con la fracción que no había sido tratada con proteasa. El experimento se realizó a una concentración de 10 % de la fracción activa, los resultados de este ensayo para cada una de las especies se pueden ver en la Figura 14.

Los controles de crecimiento empleados fueron tres: control 1 crecimiento de las células de espárrago sin la adición de medio condicionado ni proteasa, control 2 crecimiento de las células dispersas de espárrago en presencia de una alícuota de proteasa inactiva, control 3 crecimiento de las células dispersas de espárrago en presencia de 50 μ l de la fracción 200 mM de *T. erecta*, *B. ternifolia*, para el caso de *T. globosa* se utilizaron 50 μ l del MC total (según corresponda). Estos controles se emplearon para asegurar que la disminución en la proliferación celular era debida a la inactivación del factor (péptido) con la proteasa y no a una mala inactivación de la misma. En la figura 15 se pueden observar los resultados del bioensayo con las fracciones que incrementaron la proliferación celular en células de espárrago inactivadas con la proteasa de *B. licheniformis* de las tres especies usadas.

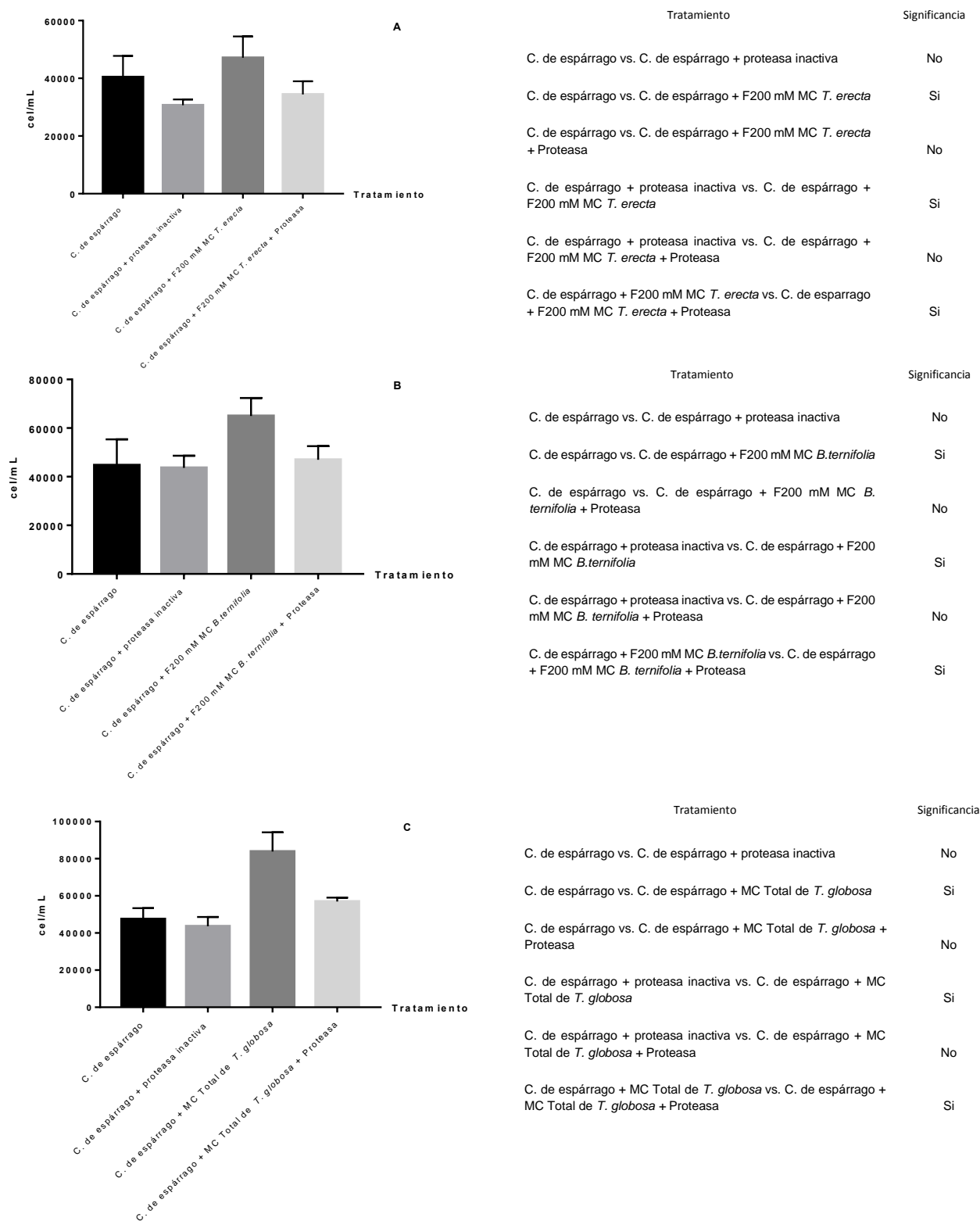


Figura 14. Efecto de la adición de la proteasa de *B. licheniformis* en la fracción activa (200 mM) del medio condicionado de *T. erecta* (A), *B. ternifolia* (B) y *T. globosa* (C) sobre el crecimiento de las células dispersas de espárrago. Y análisis de ANOVA con α de 0.05.

Mediante la aplicación del análisis estadístico de ANOVA, seguido de la prueba de Tukey, se encontró diferencia significativa entre el crecimiento de las células dispersas de espárrago tratadas con la fracción 200 mM del medio condicionado de *T. erecta* y *B. ternifolia*, así como con el medio condicionado total de *T. globosa* con respecto a las que fueron sometidas a proteólisis. Además se observó que no hay diferencia significativa entre el control de crecimiento de células de espárrago y el control de crecimiento de células de espárrago más proteasa inactiva, con lo cual se confirma que la disminución en la proliferación celular fue debido a que las fracciones activas fueron inactivadas tras el tratamiento con la proteasa y no debido a la proteasa por sí misma. En conclusión, en las fracciones de 200 mM de *B. ternifolia*, *T. erecta*, así como el MC de *T. globosa* existe un compuesto de naturaleza peptídica que es el responsable del incremento en la densidad celular. Una vez que comprobamos que el compuesto responsable del incremento de la proliferación celular posee enlaces peptídicos, se prosiguió con la purificación a través de HPLC de fase reversa.

4. HPLC de fase reversa para la purificación de las fracciones que mostraron actividad mitogénica

Con el objetivo de purificar los compuestos responsables del incremento de la proliferación celular en las fracciones de MC, se utilizó la técnica de HPLC reversa, la cual es ampliamente usada para la purificación de péptidos. Para validar nuestro sistema de separación de péptidos hidrofóbicos, se hizo pasar a través de la columna de fase reversa C8 la mezcla de estándares de péptidos, con la mezcla de las fases móviles y la utilización del gradiente previamente descritos en la sección de materiales y métodos. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 15.

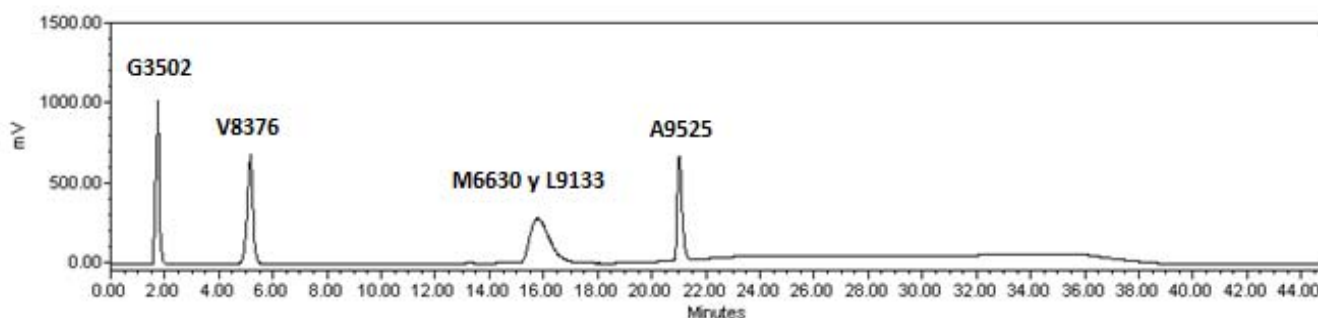


Figura 15. Cromatograma de HPLC obtenido tras la separación de la mezcla de péptidos contenidos en el estándar de péptidos para HPLC en la columna Symmetry C8 (λ 280 nm). G3502: GLY-TYR, V8376: VAL-TYR-VAL, M6630: TYR-GLY-GLY-PHE-MET, L9133:TYR-GLY-GLY-PHE-LEU, A9525: ASP-ARG-VAL-TYR-ILE-HIS-PRO-PHE.

Una vez que verificamos que las condiciones eran las óptimas para separar péptidos hidrofóbicos con pesos moleculares diferentes, procedimos a inyectar en la columna las fracciones que mostraron actividad. Desafortunadamente, no se logró la separación de ninguno de ellos, al parecer se pegan muy débilmente a la columna pues hay una señal con tiempo de retención de 2 min y de muy baja intensidad aún a 220 nm dónde se detecta el enlace peptídico.

Además de realizar las lecturas de absorbancia a 220 nm en busca de la señal del enlace peptídico, también se realizaron lecturas a 254 y 280 nm con el objetivo de buscar señales correspondientes a aminoácidos aromáticos (254 nm para detectar al aminoácido fenilalanina y a 280 para detectar a los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano), sin embargo, como puede observarse en las figuras 16 a 18 la señal detectada a 220 va disminuyendo conforme se aumenta la longitud de onda, incluso desaparece a 280 nm, lo que indica que los compuestos no presentan aminoácidos con grupos aromáticos o están en una proporción menor en comparación con el resto de los aminoácidos.

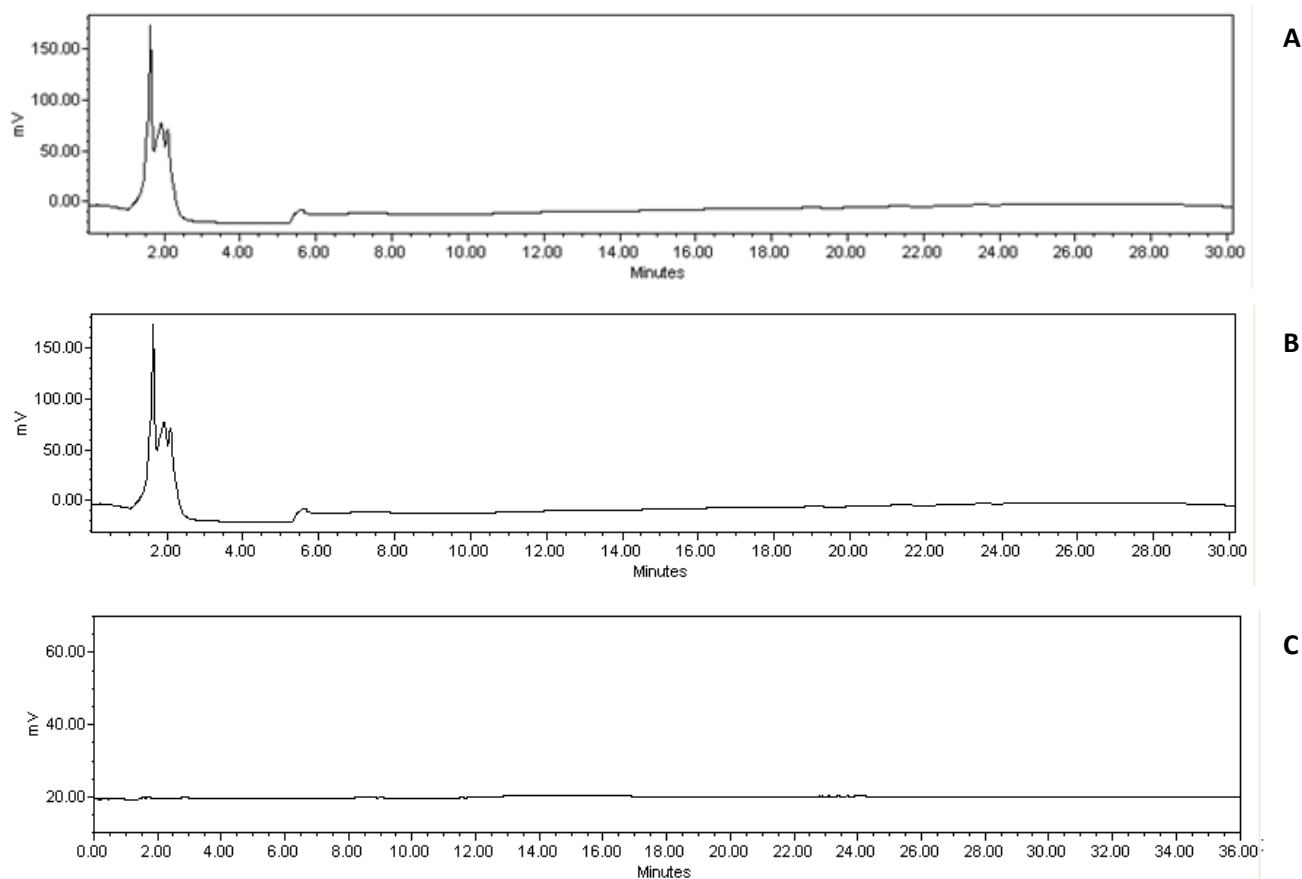


Figura 16. Cromatogramas de HPLC para la fracción 200 mM del medio condicionado de *T. erecta*, leído a 220 nm (A), 254 nm (B) y 280 nm (C).

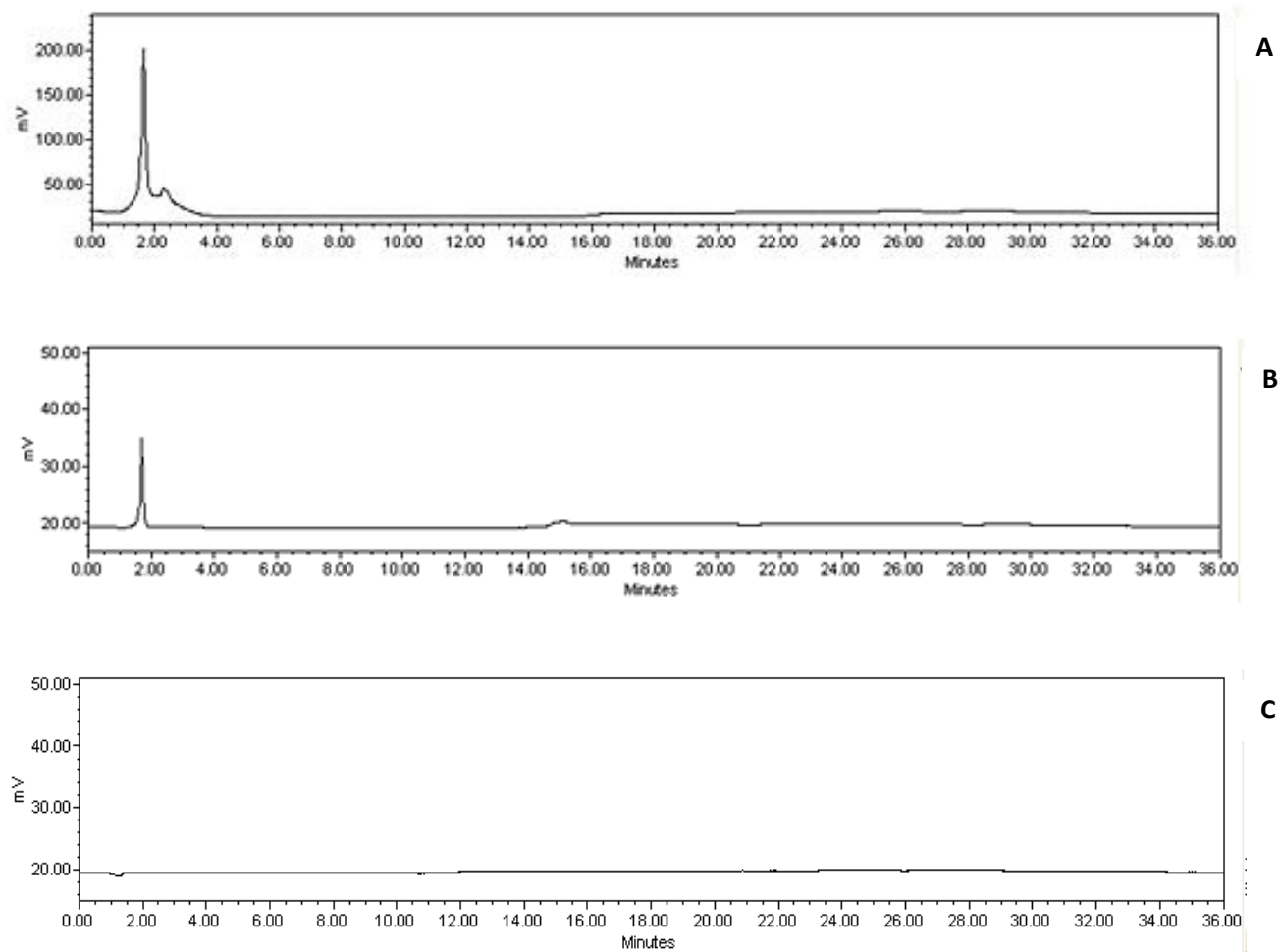


Figura 17. Cromatogramas de HPLC para la fracción 200 mM del medio condicionado de *B. ternifolia*, leído a 220 nm (A), a 254 nm (B) y 280 nm (C).

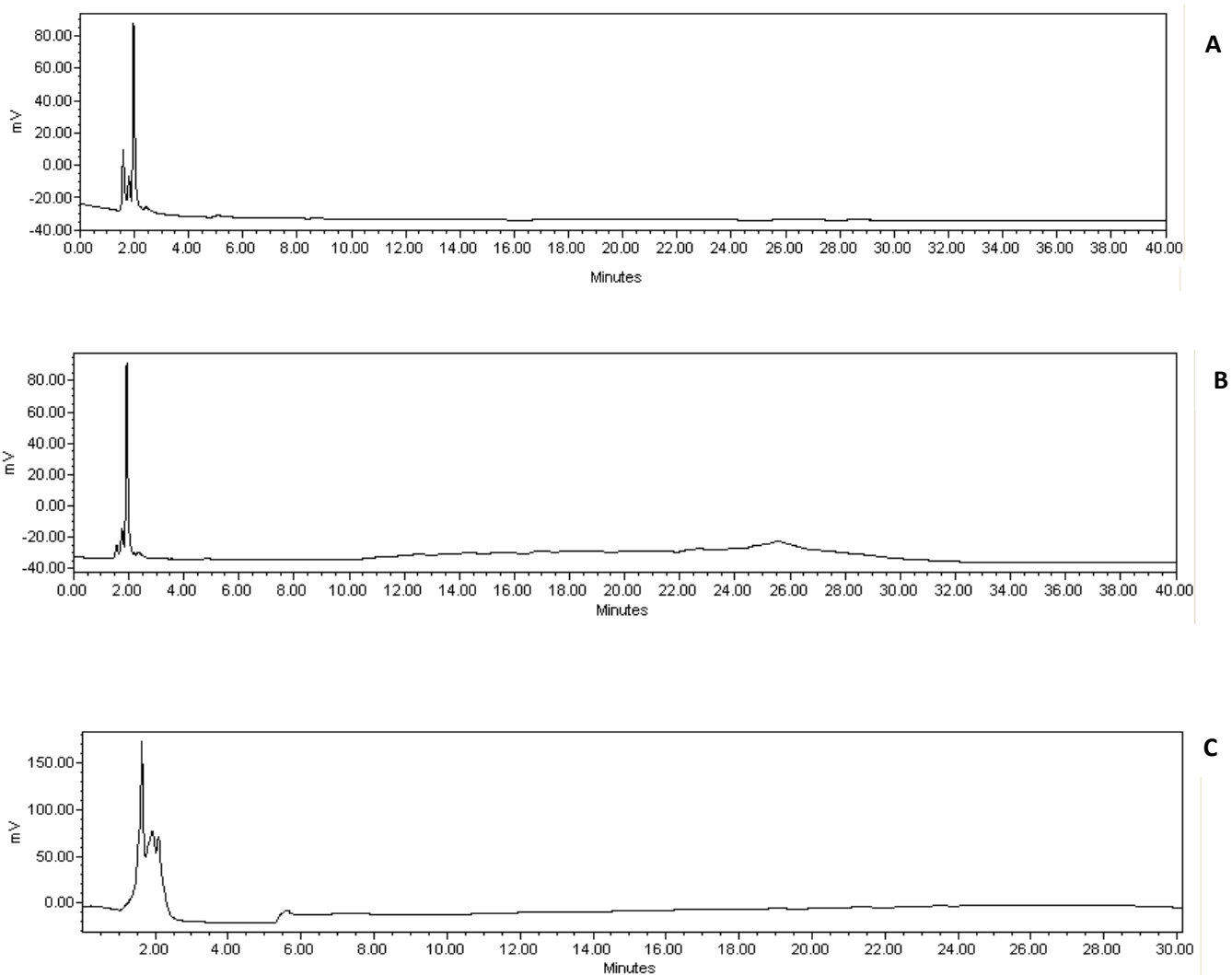


Figura 18. Cromatograma de HPLC para el medio condicionado de *T. globosa*, leído a 220 nm (A), 254 nm (B) y 280 nm (C).

Debido a que tanto la columna de C8 como las condiciones empleadas para la separación de los componentes de MC no fueron efectivas, se decidió realizar electroforesis vertical con geles de Tris-tricina para poder conocer la composición de las fracciones que mostraron actividad y de esta manera saber si era conveniente separarlas a través de una columna de filtración molecular.

5. Electroforesis en geles de Tris-tricina para determinar los pesos moleculares de los compuestos presentes en las fracciones de MC con actividad mitogénica.

Debido a que la columna de fase reversa C8 no nos permitió una adecuada separación de los componentes presentes en las fracciones de los medios condicionados con actividad, se realizó, la separación de los componentes en geles de Tris-Tricina, con el propósito de conocer el peso molecular de los componentes. En las Figuras 19 a 20 se muestran las imágenes de los geles obtenidos para cada uno de los medios condicionados totales, en la Figura 21 se observan las imágenes de los geles obtenidos para las fracciones eluidas de la columna DEAE Sephadex A-25 que mostraron actividad. Se utilizó la cadena β de la insulina como marcador de peso molecular (3945.89 Da).

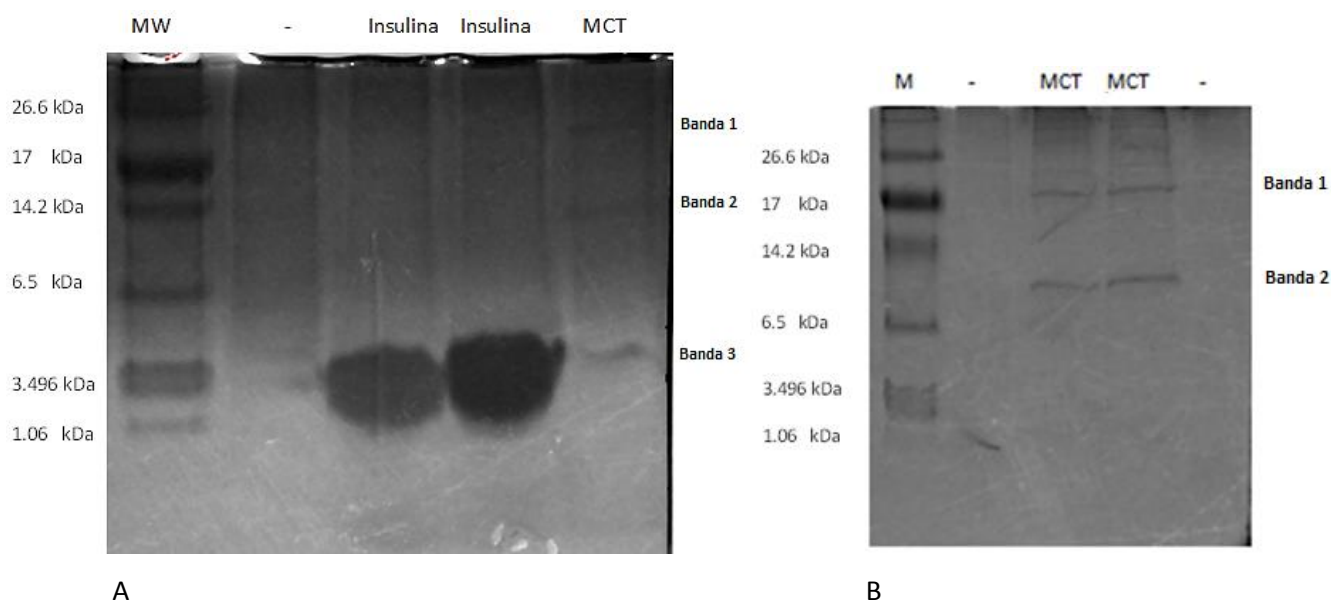


Figura 19. Geles de Tris-Tricina al 16% obtenidos para la separación de los compuestos presentes en el medio condicionado de *T. globosa*. La figura A muestra un gel cuya corrida electroforética se realizó durante 6 h, mientras que en el gel B se realizó durante 8 h. (MCT = Medio Condicionado de *T. globosa*)

Se puede observar que los geles de Tris-tricina del medio condicionado de *T. globosa* presentan diferente corrimiento de las bandas, lo cual se puede explicar por el hecho de que el gel A, fue uno de los primeros intentos y solo se corrió 6 h, mientras que el gel B se corrió por 2 h más con lo cual se logró una mejor separación de las bandas 1 y 2 pero la banda 3 ya no se observó. Sin embargo, la banda de 3.496 kDa en el carril de los marcadores moleculares persiste aún después de correr el gel por 8 h. Este resultado podría explicarse, suponiendo que la

banda de 3.496 Kda observada en la muestra cuando el gel se corre por 6 h, es la interacción de péptidos de menor PM que no lograron separarse, pero que al correrlo por más tiempo los péptidos se separan y se salen del gel. Algo similar sucede con el marcador de peso molecular de 1.06 kDa, ya que en una corrida electroforética de 6 h se observa, pero en una corrida de 8 h ya no se detectó. Por lo que las siguientes electroforesis se realizaron durante 6 h.

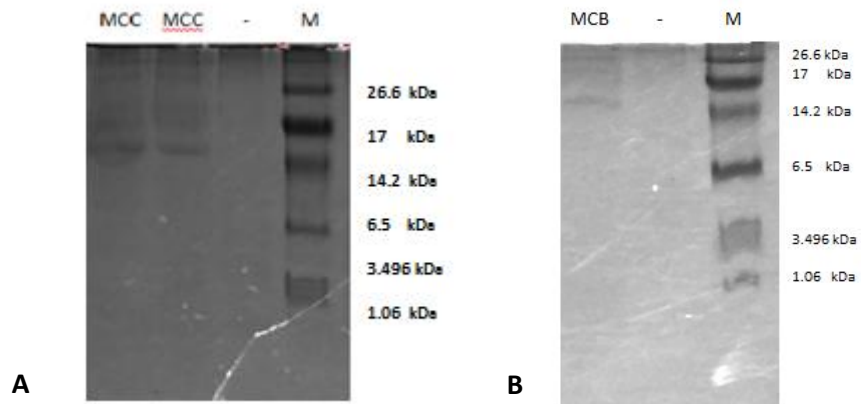


Figura 20. Gel de Tris-Tricina al 16% obtenido para la separación de los compuestos presentes en el MC de *T. erecta* (MCC) **A**, y el MC de *B. ternifolia* **B**. (MCB = Medio Condicionado de *B. ternifolia*)

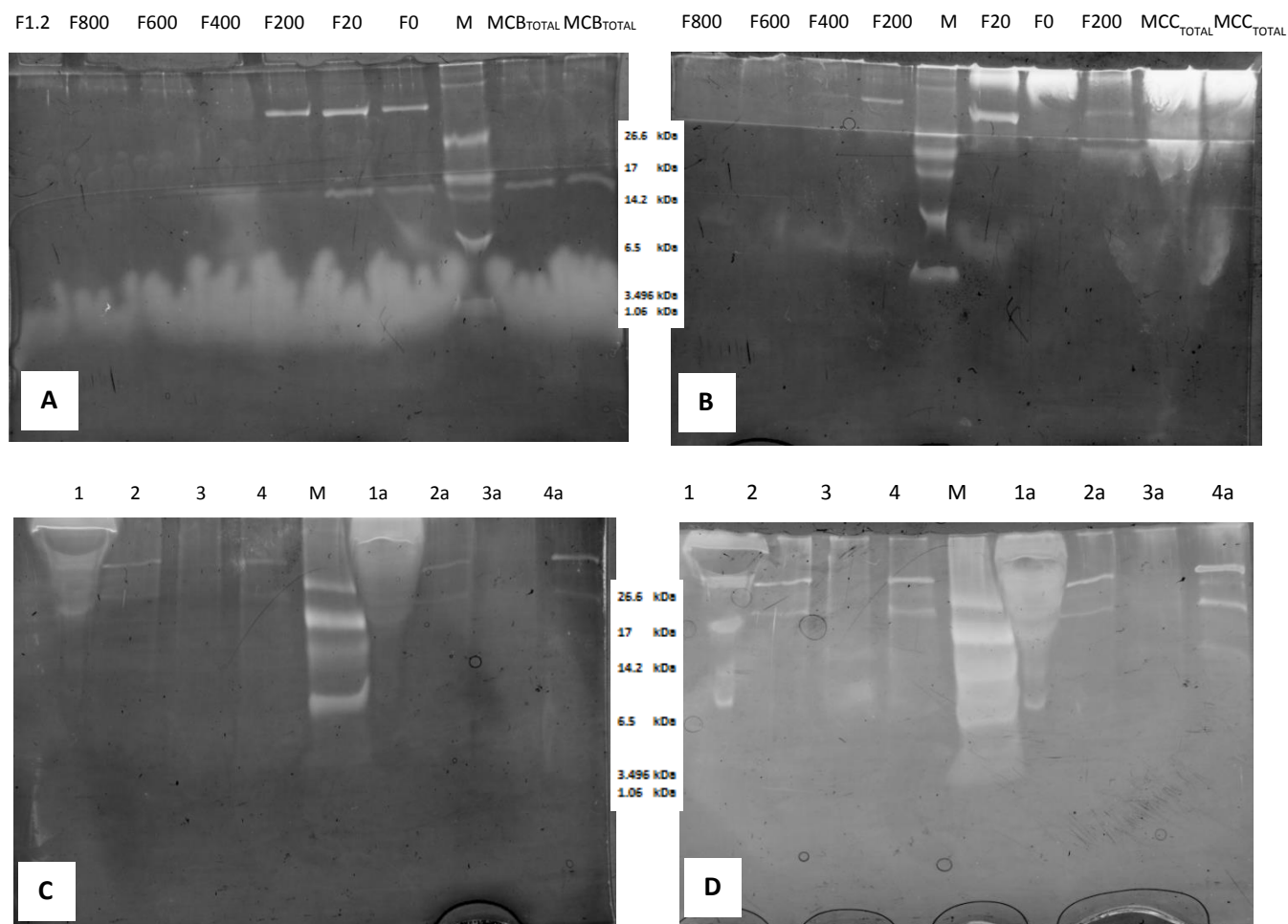


Figura 21. Geles de tris tricina al 16% de las fracciones eluidas de la columna DEAE Sephadex A25. A. Fracciones de MC *B. ternifolia*. B. Fracciones de medio condicionado *T. erecta*, para los geles A y B, se utilizó la bisacrilamida a una concentración 2X, y se utilizó un centímetro de gel al 10% para poder separar mejor las proteínas con peso mayor a 26 kDa, la tinción utilizada fue Azul de Coomasie G250. C y D. 1: Medio condicionado total de *B. ternifolia*, 2: fracción de 200mM del medio condicionado *B. ternifolia*. 3. Medio condicionado total de *T. erecta*, 4: fracción de 200mM del medio condicionado *T. erecta*. Los geles mostrados en C y D se realizaron al 16% con una concentración de bisacrilamida al 1x, la tinción para C fue azul de Coomasie G250, mientras que para D fue tinción de plata por el método de Vorum.

Con base a los resultados obtenidos con los geles de tris-tricina, podemos proponer lo siguiente, en el medio condicionado por *T. globosa*, existen al menos 3 componentes, el primero cercano a los 3.5 kDa, el segundo entre 6.5 y 14.2 kDa y el tercero de peso molecular cercano a los 17 kDa.

En el caso del medio condicionado de *B. ternifolia*, se observan principalmente tres proteínas dos de las cuales son de peso mayor a 26.6 kDa y una de peso cercano a 14kDa, tras el fraccionamiento con la columna de DEAE Sephadex A-25, se puede observar que en la fracción eluída a 200 mM que fue la que presentó actividad contiene estas tres proteínas, aunque se ve mayormente enriquecida la proteína de peso molecular intermedio entre las tres que se pueden observar.

Para *T. erecta*, en el medio condicionado total se observan una gran cantidad de proteínas, después del fraccionamiento con la columna de DEAE Sephadex A25, la fracción que presentó actividad, presenta dos proteínas una de peso mayor a 26.6 kDa y otra de un peso cercano a 17 kDa. Y al igual que con la fracción activa de *B. ternifolia* es necesario conocer cuál de las dos es la que presenta la actividad.

6. Filtración en gel de las fracciones que mostraron actividad

Con el objetivo de obtener por separado los componentes del medio condicionado de *T. globosa*, *T. erecta* y *B. ternifolia*, además de recolectar cada proteína de un peso molecular determinado y ensayar su efecto sobre las células dispersas de espárrago, se realizó la filtración de cada uno de las fracciones de MC que presentaron actividad en Bio-Gel P-10. En la Figura 22 se pueden observar los cromatogramas obtenidos para cada una de las fracciones ensayadas.

A

C

B

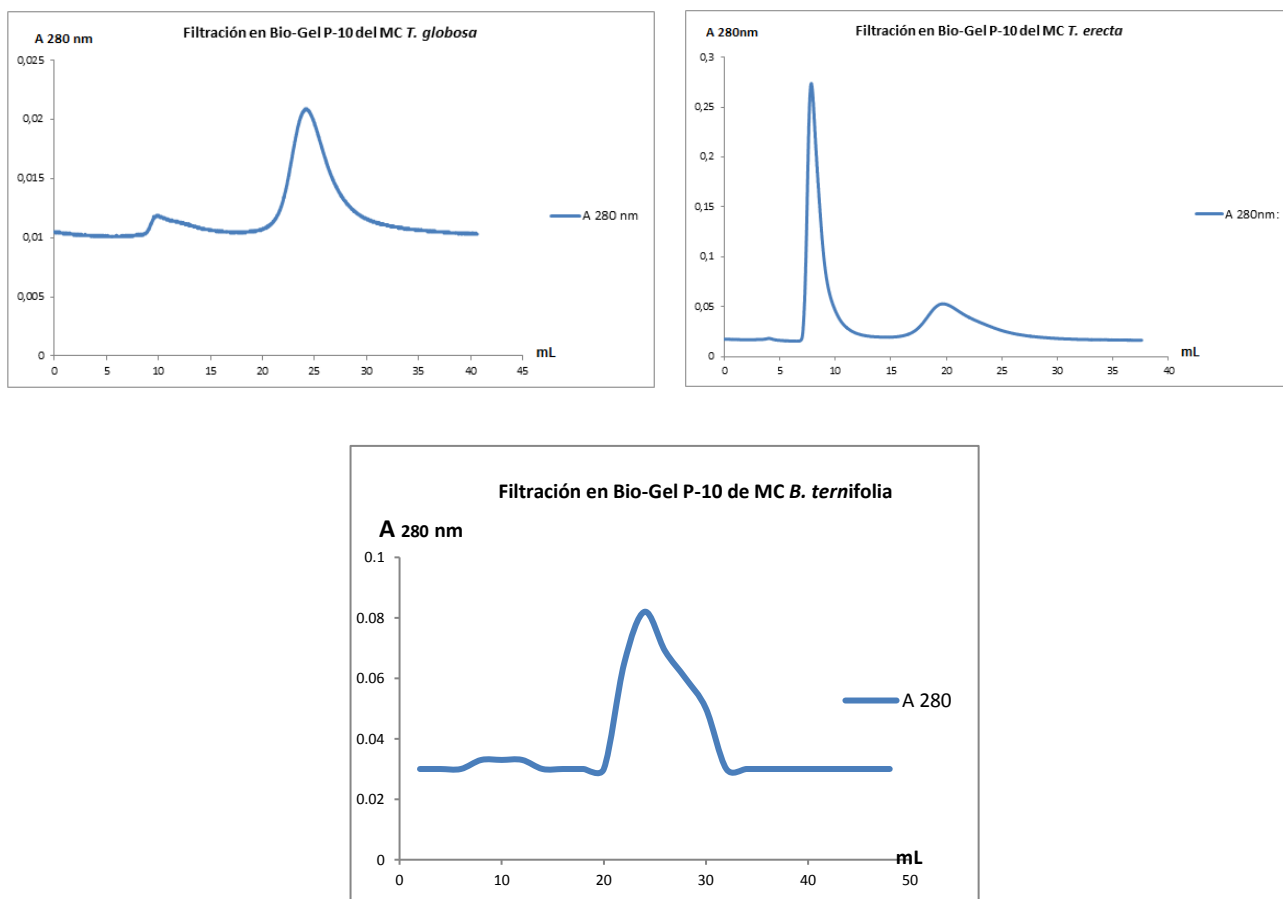


Figura 22. Separación en Bio-Gel P-10 de las proteínas presentes en el MC total de *T. globosa* (A), la fracción 200mM del MC de *T. erecta* (B) y la fracción 200 mM del MC de *B. ternifolia* (C).

Con base en la calibración de la columna de Bio-Gel P10 con el citocromo c y la insulina, al comparar los cromatogramas obtenidos para las fracciones de MC que presentaron actividad mitogénica, se tiene que para el caso del medio condicionado proveniente de *T. globosa* los dos picos obtenidos se tratarían de dos proteínas, una de peso mayor a 13400 Da (citocromo) y otra de peso menor a 4808 Da (insulina), lo mismo para el caso del medio condicionado para *T. erecta*, mientras que para el medio condicionado por *B. ternifolia*, se observa un pico muy ancho que sugiere la presencia de una mezcla de proteínas.

Los datos obtenidos de la filtración en gel y los datos obtenidos a partir de la separación en el gel de Tris-Tricina con acrilamida al 17.5% y bisacrilamida 2x, solo concuerdan en el caso de *B. ternifolia*, para el caso de *T. globosa* sólo se observan constantemente 2 de las 3 proteínas que se han podido detectar, lo cual sugiere que la tercera banda correspondiente a 3500 Da, podría tratarse de una proteína de degradación de alguna de las proteínas de peso mayor, que sólo aparece bajo ciertas condiciones. El hecho de que en la separación a través de

los geles de Tris-Tricina de *T. erecta* encontremos sólo una proteína de peso cercano a los 14 kDa y el hecho de que en la columna de filtración en gel encontremos dos picos, uno de los cuales corresponde a la proteína de 14 kDa y la otra a una proteína de menor peso, cercano a los 5kDa, sugiere que se encuentra en tan bajas concentraciones que el volumen de muestra añadido en el gel, no es el suficiente para ser detectado mediante las tinciones.

Una vez liofilizadas las fracciones obtenidas de la filtración en gel, se evaluó su efecto sobre la proliferación de las células dispersas de espárrago, con el objetivo de identificar que fracción contenía la proteína responsable del incremento en la densidad celular, medido anteriormente.

7. Ensayo de la actividad de las fracciones eluidas de la columna de filtración en gel Bio-Gel P-10

Con el propósito de determinar en cual fracción de las obtenidas a partir de la filtración con el Bio-Gel P10 que provenían de un fraccionamiento previo en la columna de Sephadex A-25 y que presentaron actividad mitogénica, se realizó el ensayo de cada una en las células dispersas de espárrago. Los resultados se muestran en la Figura 23.

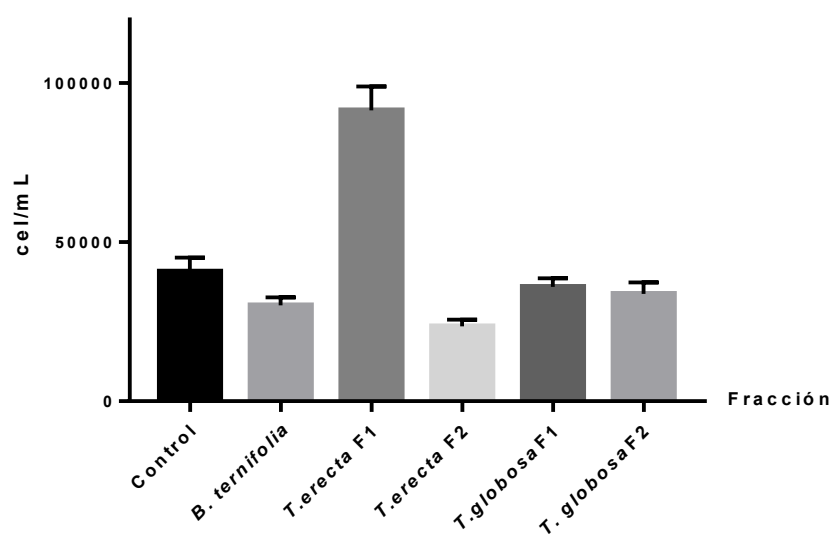


Figura 23. Bioensayo en células dispersas de espárrago para las fracciones eluidas de la columna Bio Gel P-10 del medio condicionado de las tres especies.

En la Figura 23 se observa que para el caso del pico obtenido a partir de la fracción 200 mM del MC de *B. ternifolia* tras la filtración en Bio Gel P-10, la fracción de menor peso molecular, no presentó actividad mitogénica, lo cual sugiere que pueden existir proteínas de menor tamaño que no están en una cantidad suficiente para detectar su absorbancia. Para el caso de los dos picos obtenidos a partir de la filtración en gel de la fracción 200 mM del MC de *T. erecta*, es evidente que la fracción que correspondería a una proteína cuyo peso molecular se encuentra cercano al del citocromo c, es la que presenta actividad mitogénica.

Para los picos obtenidos a partir del MC total de *T. globosa*, se puede notar que los dos picos obtenidos a partir de la filtración en gel incrementaron discretamente la proliferación celular en comparación con el control, lo cual sugiere que los componentes que producen ese incremento pueden ser de un tamaño más pequeño y estar en una menor proporción con respecto a la de los picos detectados con la sensibilidad del método empleado para la realización de la filtración en gel.

Por los motivos explicados arriba, se decidió intentar la separación de las fracciones que mostraron actividad con una columna más, la cual tenía una mejor resolución y sensibilidad.

8. Fraccionamiento a través de la columna Superdex Peptide 10/300 GL

Con el objetivo de seguir con la purificación de los componentes presentes en las fracciones 200 mM de los MC de *B. ternifolia* y *T. erecta*, así como del MC total de *T. globosa* se utilizó la columna Superdex Peptide 10/300 GL especialmente diseñada para la purificación de péptidos y cuya sensibilidad es mucho mayor que todas las columnas utilizadas anteriormente, en las Figuras 24 a 26 se muestran los cromatogramas obtenidos tras la separación en la columna para cada fracción activa. La detección de los picos se realizó a 214 nm y 280 nm. Para la calibración de los pesos moleculares se emplearon: la vitamina B12 cuyo peso molecular es 1355 Da, y la cadena B de la insulina cuyo peso es de 3496 Da, los picos eluyeron desde los 15 ml hasta los 17 ml para la cadena B de la insulina, y de 20 a 22 ml para la vitamina B12.

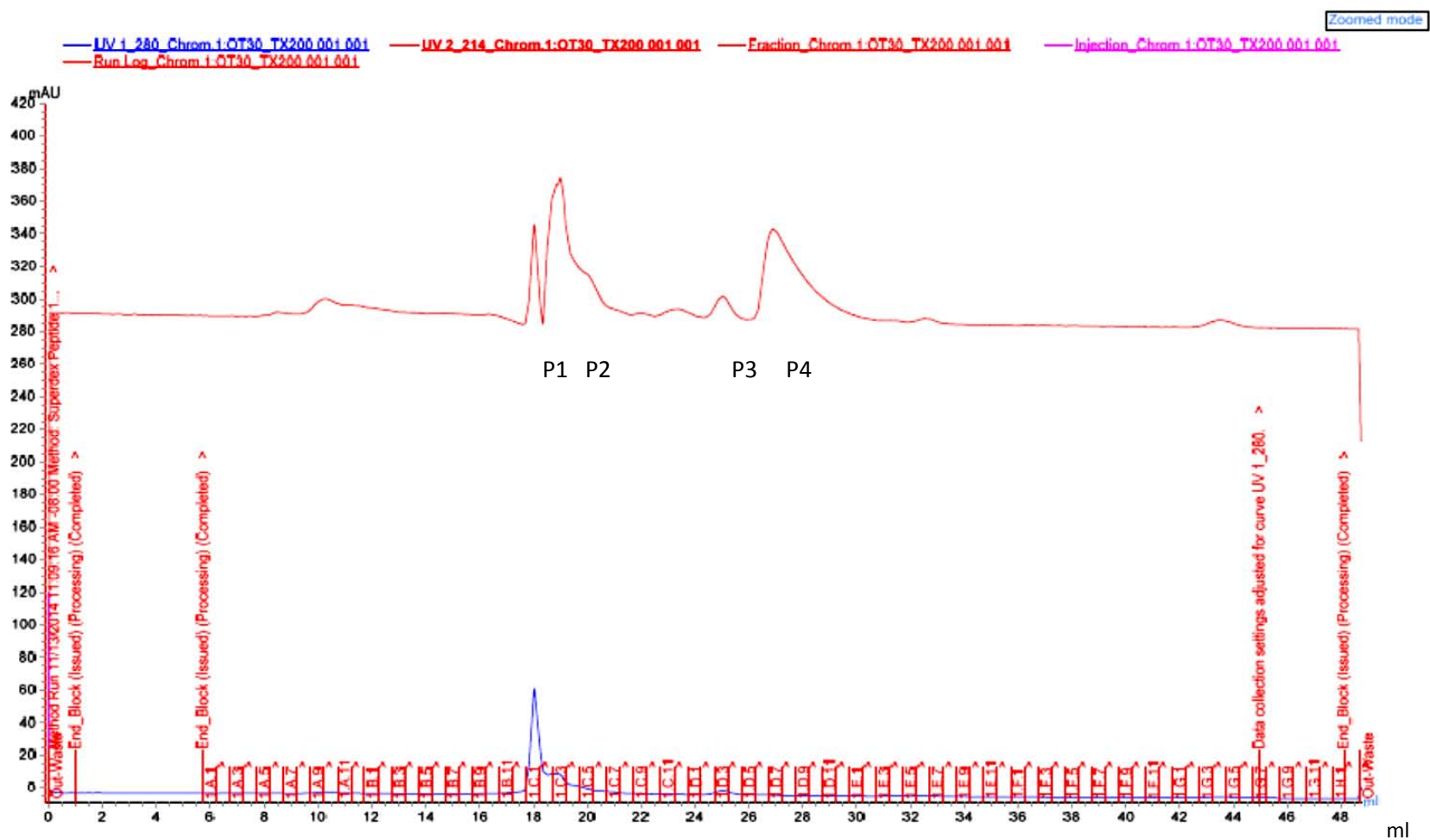


Figura 24. Fraccionamiento del MC total de *T. globosa* con la columna Superdex Peptide 10/300 GL, las fracciones se denominaron P1, P2, P3 y P4. La línea roja representa la absorbancia a 214 nm, mientras que la línea azul representa la absorbancia a 280 nm. La fracción P1 corresponde al volumen de elución 18 a 19 ml, la fracción P2 corresponde al volumen de elución de 19 a 21 ml, para la fracción P3 se tomó el volumen de elución de 25 a 26 ml, y para la fracción P4 se tomó el volumen de elución de 26.5 a 31 ml.

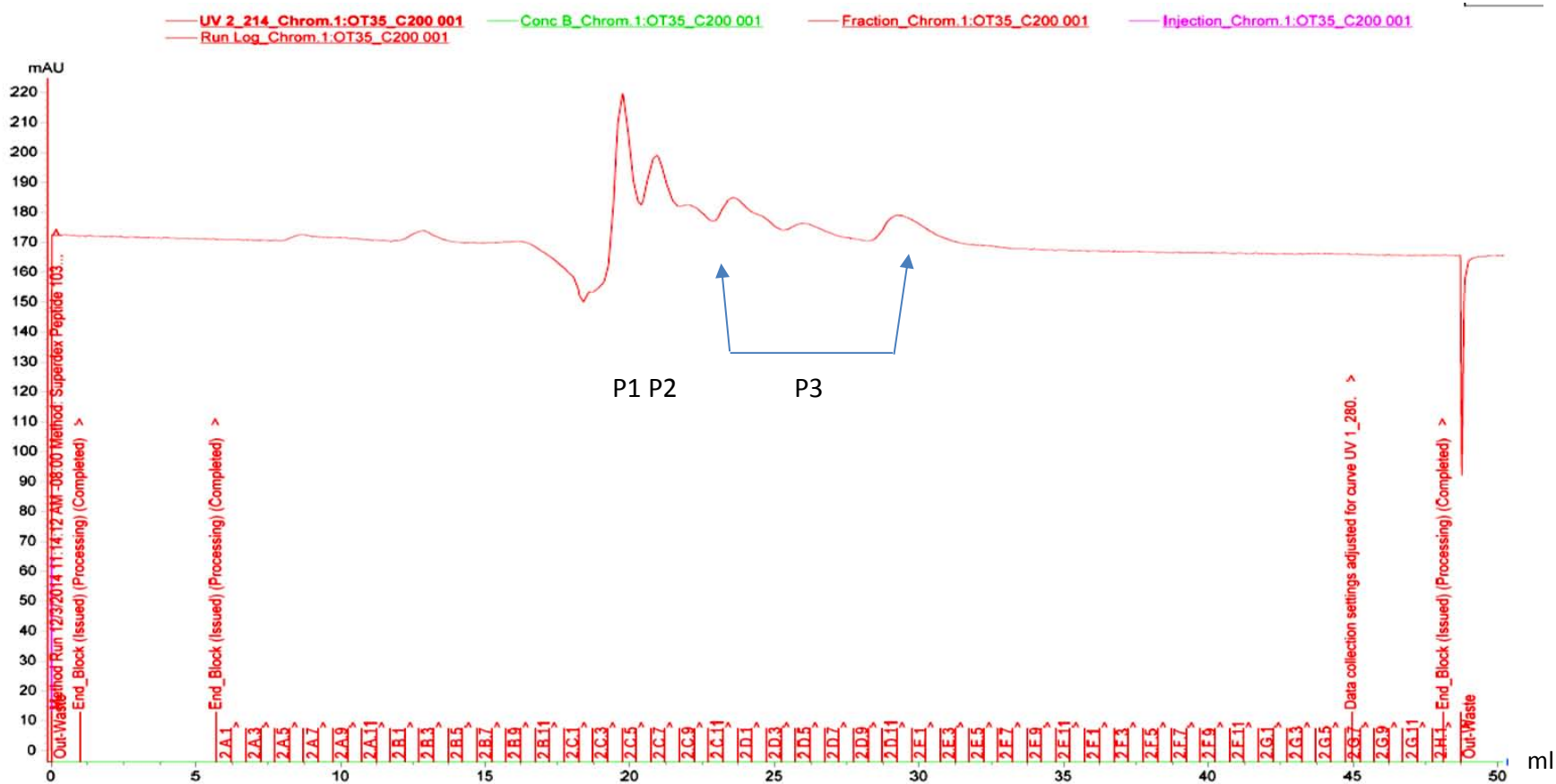


Figura 25. Separación con la columna Superdex Peptide 10/300 GL de la fracción 200 mM obtenida a partir del fraccionamiento con la columna DEAE Sephadex A25 del MC de *T. erecta*, las fracciones se denominaron P1, P2 y P3. La línea roja representa la absorción a 214 nm, mientras que la línea azul representa la absorbancia a 280 nm. La fracción P1 comprende desde el volumen de elución 19 a 20.5 ml, la fracción P2 comprende desde el volumen 21 al 22 ml y finalmente la fracción P3 comprende desde el volumen 23 al 30 ml.

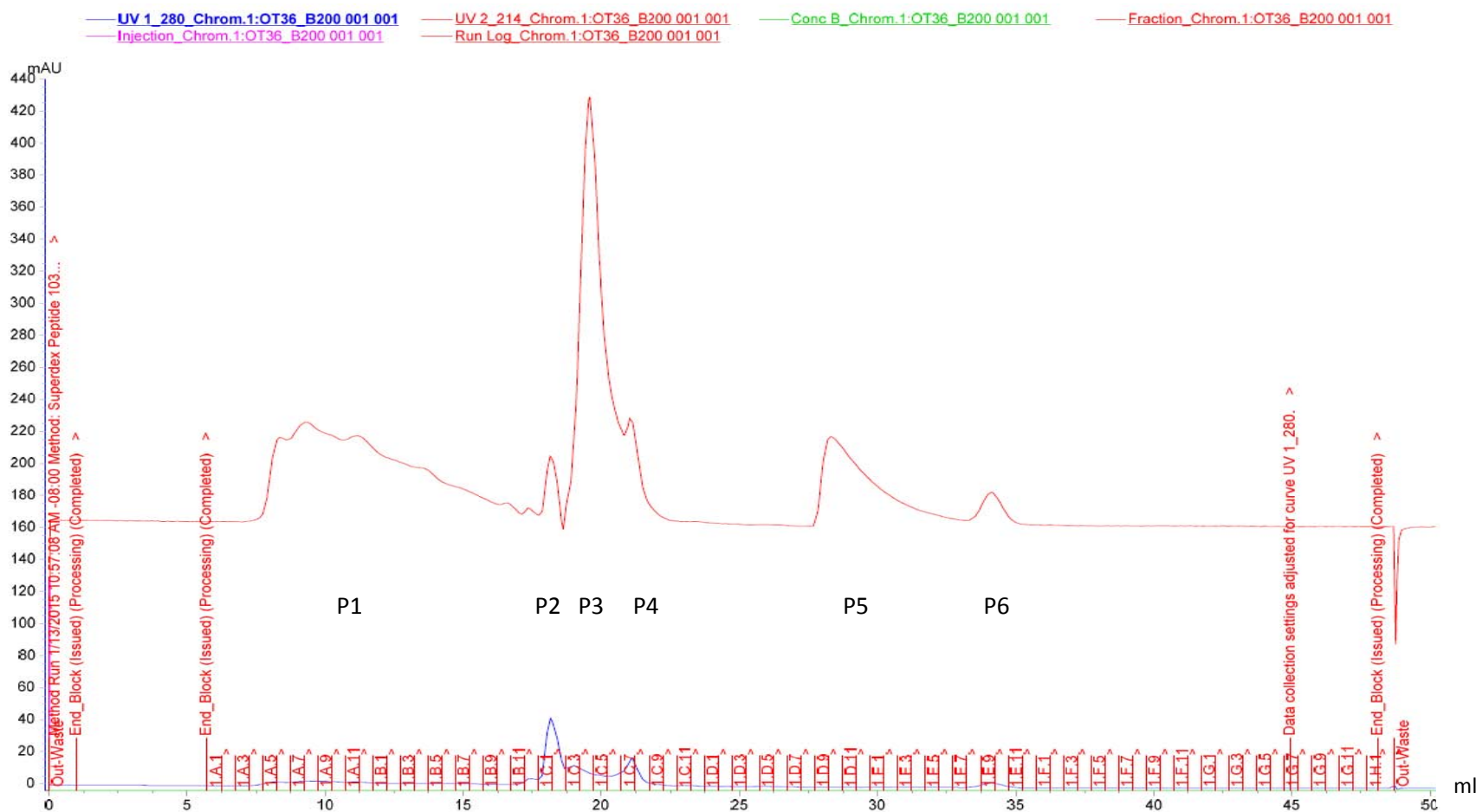


Figura 26. Separación con la columna Superdex Peptide 10/300 GL de la fracción 200 mM obtenida a partir del fraccionamiento con la columna DEAE Sephadex A25 del MC de *B. tenifolia*, las fracciones se denominaron P1, P2, P3, P4, P5 y P6. La línea roja representa la absorción a 214 nm, mientras que la línea azul representa la absorbancia a 280 nm. Los volúmenes de elución que se tomaron para las fracciones fueron las siguientes: P1 de 8 a 13 ml, P2 de 18 a 19 ml, P3 de 19 a 21 ml, P4 de 21 a 22 ml, P5 de 28 a 33 ml.

Tras la separación con la columna Superdex Peptide 10/300 GL encontramos presencia de péptidos con peso menor a 3500 Da, también observamos que la mayoría de los picos obtenidos no presentan absorción a 280 nm, solo a 214 nm lo cual indica que la mayoría de estos péptidos no contienen aminoácidos aromáticos o su abundancia es escasa. Además de que la composición de las fracciones previamente separadas en la columna Sephadex A-25 es aún compleja.

Después del fraccionamiento, cada uno de los picos fue colectado, se eliminó la fase móvil y se determinó la cantidad de proteína para después ensayar el efecto de cada uno tanto en las células dispersas de espárrago como en las células de la especie en donde se obtuvo el medio condicionado.

9. Bioensayo de las fracciones eluidas de la columna Superdex Peptide 10/300 GL

Con el propósito encontrar actividad mitogénica en alguno de los picos eluidos de la columna Superdex Peptide 10/300 GL para la separación de los componentes presentes en las fracciones 200 mM eluidas de la columna Sephadex A-25 que previamente mostraron actividad mitogénica (para las especies *B. ternifolia* y *T. erecta*) y el MC total de *T. globosa*, se realizó el bioensayo en células dispersas de espárrago como primer paso, seguido del bioensayo en las células homólogas de donde se obtuvo el MC para cada especie. En las siguientes secciones se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los bioensayos realizados.

10. Bioensayo en células dispersas de espárrago; incremento del número de células

Este bioensayo se realizó como primer paso para conocer si alguna fracción mostraba actividad mitogénica, en especial, para saber si el incremento en la proliferación celular se debía a un incremento en el número de células, lo cual se puede relacionar directamente a un incremento en la división celular. En la Figura 27 se observan los resultados para el bioensayo de los picos obtenidos tras el fraccionamiento con la columna Superdex Peptide 10/300 GL para cada una de las especies.

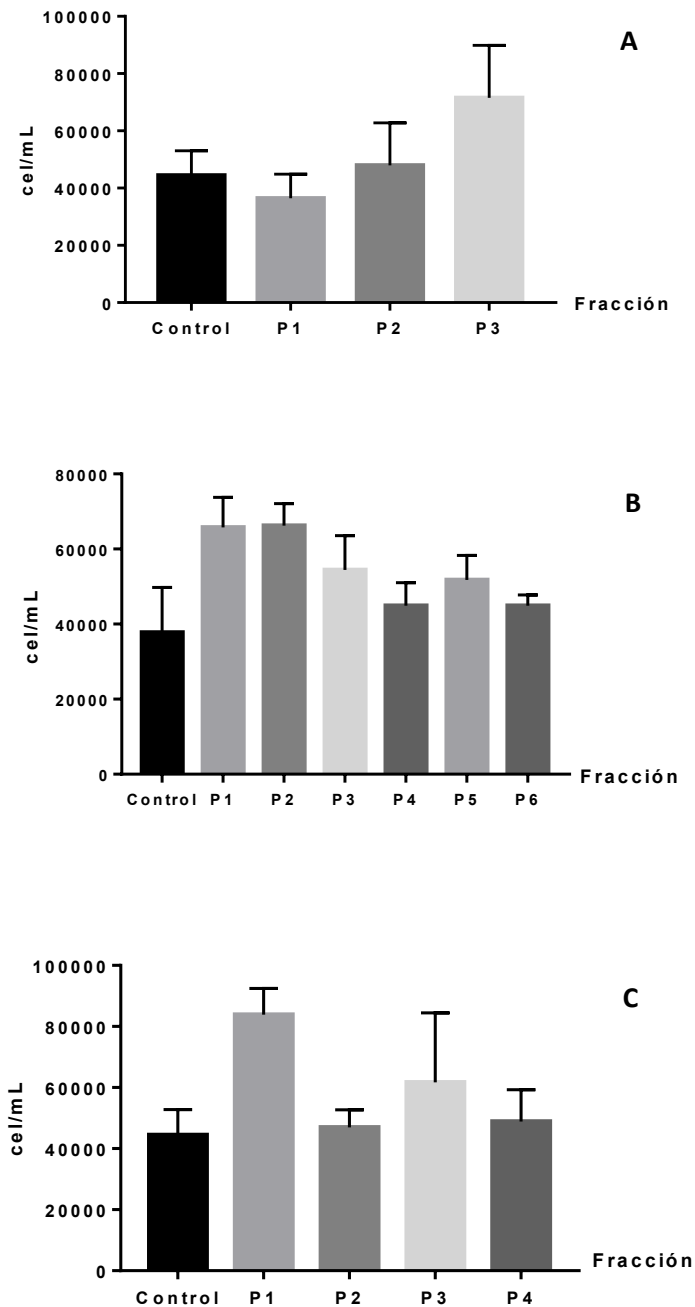


Figura 27. Efecto de la adición de las fracciones obtenidas tras la separación en la columna Superdex Peptide GL 10/300 de; A. La fracción (columna Sephadex A-25) 200 mM de acetato de amonio de *T. erecta*, B. La fracción 200 mM de acetato de amonio de *B. ternifolia* (columna Sephadex A-25), y C. Del MC de *T. globosa* en la proliferación de las células dispersas de espárrago.

Los resultados indican que para cada especie al menos una de las fracciones eluidas de la columna de Superdex Peptide 10/300 GL posee actividad mitógena ya que en el bioensayo con células de espárrago incrementa la densidad celular respecto al control. Para el caso de *T. erecta* se trata de la fracción P3, a diferencia de *B. ternifolia* en que todas las fracciones presentaron actividad mitógena aunque la inducción de la proliferación de P1 y P2 fue mayor 1.6X, y 1.4X respectivamente. Respecto al tamaño molecular de los péptidos con actividad mitógena, el de *T. erecta* fue menor de 1346 Da, pues su volumen de elución fue mayor que el de la vitamina B12. Mientras que en el caso de *B. ternifolia* el peso molecular de P1 fue mayor de 3496 Da que es el PM de la cadena B de la insulina que se utilizó para calibrar la columna Superdex. Los otros tres picos fueron menores de 1355 Da, ya que eluyeron después de la vitamina B12 el otro compuesto utilizado para la calibración de la columna.

Finalmente para el caso de *T. globosa* también se trata de la fracción P1, además, las fracciones 3 y 4 también presentaron actividad mitógena aunque menor que la fracción P1. Una vez comprobada la existencia de péptidos con actividad proliferativa en las fracciones de los medios condicionados sobre las células dispersas de espárrago, se decidió comprobar que este efecto estuviera presente en las células homólogas de donde se obtuvo el MC.

11. Bioensayo en cultivos en suspensión celular de la especie de donde se extrajo el MC; incremento del PCV y aumento en el peso seco

Con el objetivo de saber si los picos obtenidos tras el fraccionamiento con la columna Superdex Peptide 10/300 de GL también incrementaban la proliferación en las células homólogas de donde fueron obtenidos los MC, se realizaron dos bioensayos midiendo dos parámetros diferentes: 1) incremento en el volumen del paquete celular y 2) incremento en el peso seco, con el primer método se mide indirectamente un aumento ya sea en el número de células o un aumento en el volumen de las células, mientras que en el segundo método se mide directamente un aumento en la biomasa, es decir, un aumento en el número de células, lo cual queda comprobado con el bioensayo de espárrago en el que, tras el conteo celular se puede hablar certeramente de un aumento en la división celular. En las Figuras 29 y 30 se encuentran los resultados obtenidos para cada uno de los dos bioensayos realizados a cada una de las fracciones obtenidas tras el fraccionamiento.

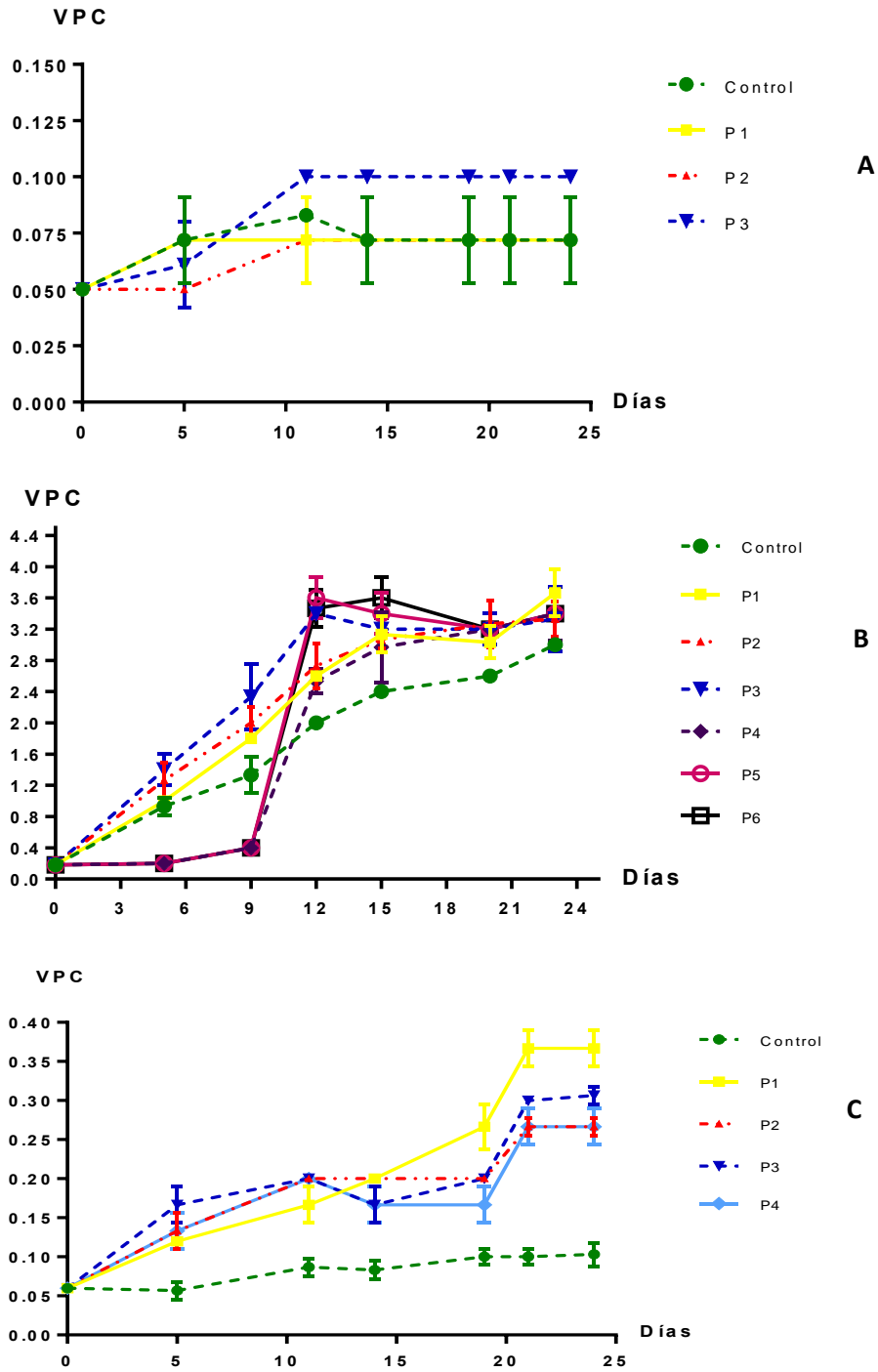


Figura 29. Efecto de la adición de las raciones obtenidos tras la separación en la columna Superdex Peptide 10/300 GL de la fracción; A. 200mM de acetato de amonio de *T. erecta*, en el Volumen de paquete celular (VPC) de las suspensiones celulares de *T. erecta*. B. La fracción 200mM de acetato de amonio de *B. ternifolia*, en el VPC de las suspensiones celulares de *B. ternifolia*. C. El MC de *T. globosa*, en el VPC de las suspensiones celulares de *T. globosa*.

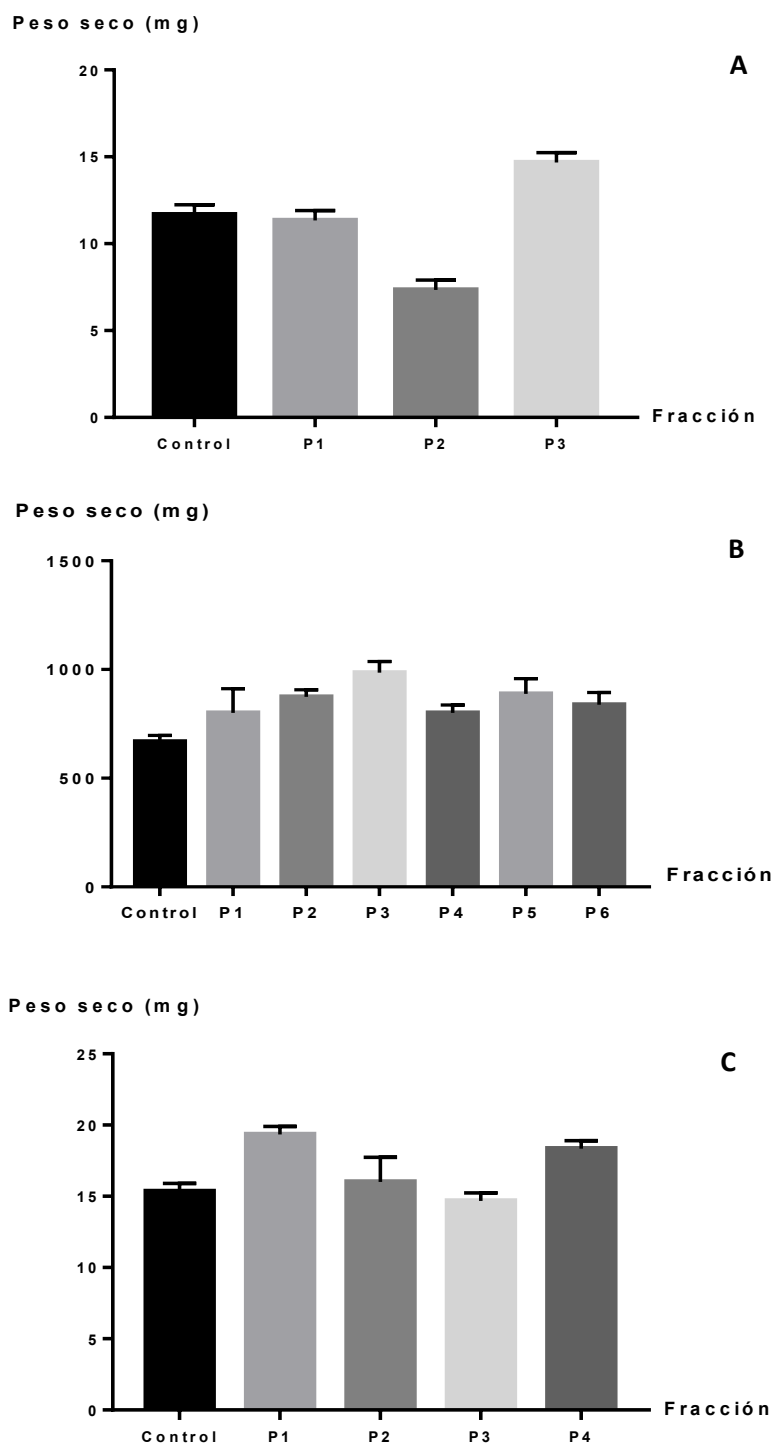


Figura 30. Efecto de la adición de las fracciones obtenidas tras la separación en la columna Superdex Peptide 10/300 GL de; A. La fracción 200mM de acetato de amonio de *T. erecta* en el peso seco de las suspensiones celulares de *T. erecta*, B. La fracción 200mM de acetato de amonio de *B. ternifolia* en el peso seco de las suspensiones celulares de *B. ternifolia*, y C. El MC de *T. globosa*, en el peso seco de las suspensiones celulares de *T. globosa*. El peso inicial para el bioensayo de *T. erecta* fue de 49 mg, para *B. ternifolia* fue de 6 mg y para el caso de *T. globosa* de 3.5 mg.

A partir de los resultados obtenidos para cada pico en los tres bioensayos realizados podemos decir lo siguiente:

- Para el caso de la separación de la fracción 200 mM de acetato de amonio MC *T. erecta* (columna DEAE Sephaadex A25), en la columna Superdex Peptide 10/300 GL, la fracción P3 fue la que mostró la mayor actividad mitogénica en comparación con el control para los tres bioensayos, es decir, éste produce un mayor aumento en el número de células y en la biomasa. Sin embargo, esta fracción debe seguir purificándose pues se puede notar la presencia de varias señales de péptidos.
- Para la separación de la fracción 200 mM de acetato de amonio del MC de *B. ternifolia*, en la columna Superdex Peptide 10/300 GL, la fracción P1 fue la que genera un mayor incremento en la proliferación celular en los bioensayos en células de espárrago y en el de células en suspensión de *B. ternifolia* donde se mide el incremento en el VPC, sin embargo, en el bioensayo de células en suspensión donde se mide el incremento en el peso seco, la fracción P3 fue la que mostró la mayor actividad. Lo cual nos indica que existen al menos dos compuestos con actividad mitogénica.
- Para la separación del MC de *T. globosa* en la columna Superdex Peptide 10/300 GL, en los tres bioensayos la fracción P1 fue la que mostró un mayor incremento en la proliferación celular.

Una vez identificadas las fracciones eluidas de la columna Superdex Peptide 10/300 GL que mostraron la mayor actividad mitogénica, se procedió a coleccionar la cantidad suficiente de proteína determinada por medio del método del ácido bicinchonínico, para realizar el análisis de espectrometría de masas a los componentes presentes en las fracciones.

12. Determinación de la secuencia de aminoácidos de los compuestos presentes en las fracciones activas

Mediante el análisis de HPLC/MS/MS de la fracción denominada P1 proveniente de la columna Superdex Peptide 10/300 GL del MC de *T. globosa*, se determinó que existen por lo menos seis compuestos presentes en esta fracción (Figura 31C), estos compuestos fueron sometidos a la acción de la tripsina y quimiotripsina (Figuras 31A y 31B respectivamente). Cada uno de los compuestos presentes en P1, los intactos y los procesados con tripsina y quimiotripsina se sometieron al análisis de MS/MS. Las secuencias propuestas a partir del análisis con MASCOT se presentan en las Tablas 8 a 10. De las secuencias propuestas solo 5 tienen una probabilidad de 100 0 cercana a 100.

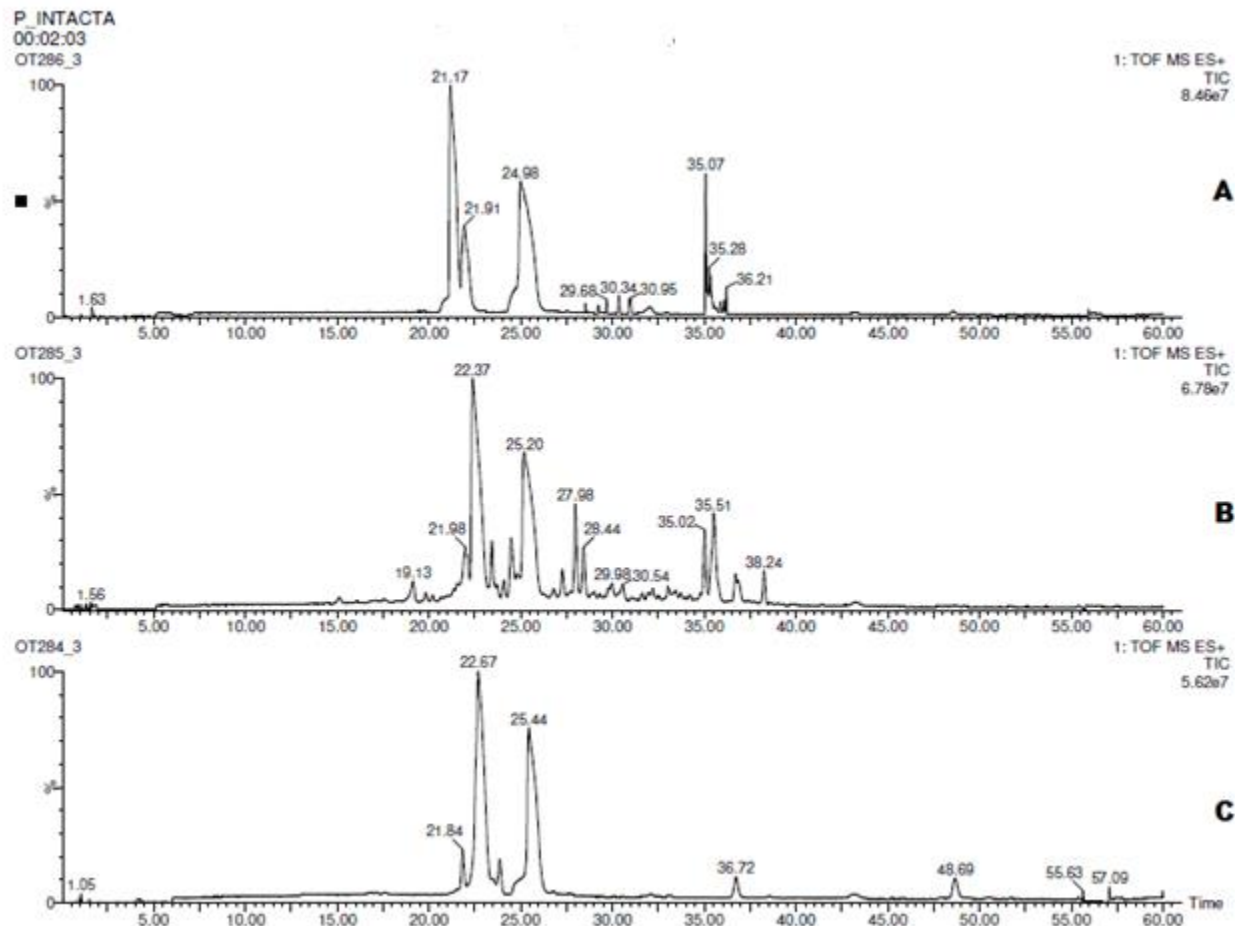


Figura 31. Cromatograma de los péptidos presentes en la fracción P1 del MC de *T. globosa* con el sistema integrado nano-LC_ESI_MS/MS. A. Procesamiento con tripsina, B. Procesamiento con quimotripsina, C. Fracción intacta.

Tabla 8. Masa del ión molecular, secuencia propuesta y la probabilidad de que ésta sea la correcta, para cada uno de los péptidos encontrados en el cromatograma HPLC para la fracción P1 intacta.

Tiempo de salida en el cromatograma HPLC (min)	Masa del ión mol (Da)	Secuencia	Score	Joint prob.	Prob %
21.834	1045.5330	DRVYLHPF	262	210	100
22.674	774.4203	VYLMLH	14	18	34.46
23.843	831.4275	GVYLHPF	36	78	100
25.574	555.2775	YGGFL	12	23	47.11
36.718	598.2776	GFGYVG	6	63	44.15
48.688	330.1810	PSK	0	28	97.99

Tabla 9. Masa del ión molecular, secuencia propuesta y la probabilidad de que ésta sea la correcta, para cada uno de los péptidos generados tras el procesamiento con quimiotripsina de la fracción P1.

Tiempo de salida en el cromatograma HPLC (min)	Masa del ión mol (Da)	Secuencia propuesta por el software del equipo	Score	Joint prob.	Prob %
19.131	1121.5924	VYFFLSSLM	1	-7	11.95
21.977	775.4220	QQLKLM	0	-25	42.47
23.403	4245.8628	VYCEYMDYASYQYYERAAKEYQYYVVGVVVLW	1	-109	24.53
22.436	4005.6614	ELFARLLKRLLLLLLEFFVDLRLFRGNLLRC	1	-148	5.12
24.471	555.2775	YGGFL	30	53	100
27.269	1712.8049	FGLFQFNFFRPM	0	-54	4.03
25.438	3853.69361	RAGWFYNEYDEEQLKFLEGTFAEGEEFFQ	1	-143	46.20
27.979	4152.8799	NVWVGAQTLDDNEEEADKLEPDEEVLADRRQQ	3	-46	43.79
28.439	4399.1294	LFELEDYLSFDTGLDDELELLDFLDFLLDLLL	0	-153	12.51
35.019	1540.7444	YALLYALLEYM	0	-46	31.02
35.512	4271.0205	YGGFLDPMYGLLPFPVDQCLFLYFLPFFNDN	26	-35	6.10
36.715	2876.3933	FTLETDLFTESETEEFLLELPTC	0	-101	16.20

Tabla 10. Masa del ión molecular, secuencia propuesta y la probabilidad de que ésta sea la correcta, para cada uno de los péptidos generados tras el procesamiento con tripsina de la fracción P1.

Tiempo de salida en el cromatograma HPLC (min)	Masa del ión mol (Da)	Secuencia propuesta por el software del equipo	Score	Joint prob.	Prob %
21.270	1045.6370	GARRFRRK	0	36	100
21.947	574.2598	AELEN	0	-26	26.67
24.982	554.3428	VLPNL	0	-24	22.13
32.018	456.2332	PAAAAG	0	-16	73.65

Se encontró la secuencia de tres de los seis compuestos de la fracción P1, en orden de elución son las siguientes, Asp-Arg-Val-Tyr-Leu-His-Pro-Phe, Gly-Val-Tyr-Leu-His-Pro-Phe que es prácticamente el anterior pero con un amino ácido menos, y Pro-Ser-Lys.

En los resultados del análisis de los compuestos generados tras la hidrólisis con quimiotripsina se encontró únicamente un péptido: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, el cual se había identificado desde el análisis del P1 intacto, sin embargo, en ese análisis no presentó una buena probabilidad.

Finalmente, en el análisis del P1 hidrolizado con tripsina se identificó el péptido Gly-Ala-Arg-Arg-Phe-Arg-Arg-Lys, el cual no había sido identificado en los dos análisis anteriores.

Las fracciones obtenidas de la columna de intercambio iónico para *T. erecta* y *B. ternifolia*, no se analizaron por HPLC-MS/MS.

El patrón de corte con quimiotripsina de la fracción P1, contiene una mayor cantidad de fragmentos de péptidos que el patrón de corte obtenido con el uso de la tripsina (patrón de corte de todos los péptidos que componen la fracción activa)

Con respecto al corte de las proteasas, la tripsina corta en el carboxilo terminal presente en residuos básicos como la lisina, arginina e histidina, mientras que la quimiotripsina corta en el carboxilo terminal de residuos hidrofóbicos como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano o metionina adyacentes a un aminoácido hidrofóbico. Y los péptidos identificados en la fracción P1 de la columna Superdex Peptide 10/300 GL del MC de *T. globosa*, poseen una mayor cantidad de residuos hidrofóbicos adyacentes a los aminoácidos con grupos aromáticos tirosina y fenilalanina.

DISCUSIÓN

Los medios condicionados totales de las tres especies aquí estudiadas mostraron actividad mitogénica, cuando su actividad se exploró con células de esparrago. En trabajos anteriores se ha demostrado que las células vegetales en suspensión no se dividen cuando la densidad del cultivo es menor de 10^5 células ml^{-1} (8,17), por lo que para demostrar la presencia de factores mitogénicos o proliferativos en los MC se utilizaron densidades celulares iniciales de 10^4 ml^{-1} . La estimulación de la división celular mostrada por los diferentes medios condicionados no fue cuantitativamente similar, ya que la cantidad de proteína adicionada fue diferente aunque la concentración de medio condicionado vol/vol fue la misma en todos los casos. El MC de *T. globosa* fue más efectivo en incrementar la proliferación celular que el de *T. erecta* o de *B. ternifolia* ya que con una concentración de 20 % (v/v) de MC la proliferación celular del primer tipo de cultivo se incrementó 2.5 veces, mientras que con los dos últimos, el incremento fue de solo 1.4 veces.

Una vez demostrada la presencia de uno o varios factores mitogénicos en el MC total y asumiendo, por reportes anteriores (8, 17, 20) que era de naturaleza peptídica, se procedió a extraerlos del MC con fenol y posteriormente fraccionarlos en la columna de intercambio aniónico, misma que se utilizó en la identificación del péptido fitosulfoquina (20). En el caso de los posibles péptidos mitogénicos de *T. erecta* y de *B. ternifolia*, la fracción con mayor actividad proliferativa fue la eluida con 200 mM de acetato de amonio ($F_{200\text{ mM}}$). Mientras que para el MC de *T. globosa*, en ninguna de las fracciones se encontró una actividad similar a la producida por el MC sin fraccionar. Lo que sugería que estos péptidos eran ácidos y no se habían pegado a la columna. Sin embargo, la fracción que no se pega a la columna fue inactiva. Por lo que se concluyó que durante la extracción fenólica el factor proliferativo se inactivó. Por lo anterior en los experimentos siguientes se utilizó el MC total. En este caso, al igual que en los otros dos cultivos, el factor o factores mitogénicos presentes en el medio condicionado fue de naturaleza peptídica, ya que perdieron actividad al proteolizarse previamente a la realización del bioensayo.

Los péptidos presentes en las $F_{200\text{ mM}}$ de *T. erecta* y de *B. ternifolia* contenían péptidos o proteínas básicas, pues se unieron a una columna de intercambio aniónica y su naturaleza es peptídica pues su actividad proliferativa se inactivó al ser proteolizadas previo al bioensayo.

Posteriormente, se intentó separar y conocer la masa molecular de los compuestos presentes en la $F_{200\text{ mM}}$ de *B. ternifolia* y *T. erecta*, así como el MC de *T. globosa*, con el uso de HPLC de fase reversa, una técnica ampliamente usada para la separación de péptidos, sin embargo, no se logró la separación de los compuestos de las fracciones activas. Con los resultados obtenidos, se propone que los compuestos parecen no contener aminoácidos con grupos aromáticos o su concentración con respecto a los demás aminoácidos es muy baja, pues no se detectaron compuestos a 280 nm, pero sí se detectaron a 254 nm y 214 nm.

Al no tener éxito con la técnica de HPLC de fase reversa, se optó por el uso de electroforesis con geles de tris-tricina al 16%, los resultados obtenidos sugieren que predominan en las fracciones activas compuestos de masas moleculares por arriba de los 10 kDa. Para el MC de *T. globosa* se encontraron proteínas con peso molecular de 17 kDa, y péptidos cercanos a los 8 kDa y 3.5 kDa: para *B. ternifolia* y *T. erecta*, se encontraron proteínas con peso molecular entre los 14.2 y 17 kDa, y con masa superior a los 26 kDa. Con el conocimiento de los pesos moleculares de los compuestos presentes en las fracciones activas, se inició con la separación de estos con la técnica de exclusión molecular, primero a través de la columna de BioGel P-10 y posteriormente con la columna Superdex Peptide 10/300 de GL.

Para la columna de BioGel P-10, usamos dos marcadores de masa molecular (14 kDa y 5 kDa) para tener una idea de la masa molecular de los compuestos presentes en las fracciones que mostraron actividad. En el caso de *T. erecta* y *B. ternifolia*, ambas fracciones presentaron una discreta actividad mitogénica, pero no *T. globosa*. Llama la atención que la eliminación de proteínas de pesos moleculares mayores de 20 kDa del MC o de la F_{200mM} disminuyera la efectividad mitogénica de la fracción. Aunque en este caso no se recogieron fracciones de menor peso molecular a 5KDa, posiblemente su abundancia en la muestra no fue suficiente para ser detectados por este método ni por electroforesis desnaturizante, otra posibilidad es que los péptidos no fueron retenidos por la malla de acrilamida ya que la banda del marcador de peso molecular 1060 en la mayoría de las veces no fue detectada.

Con el objetivo de determinar si la actividad mitogénica de las F_{200} de *T. erecta* y de *B. ternifolia* o la de MC de *T. globosa* era debida a moléculas peptídicas menores de 5000 kDa, se utilizó la columna Superdex Peptide 10/300 de GL, la cual fue especialmente diseñada para la separación de mezclas de péptidos y tiene una alta resolución en un rango comprendido entre los 100 a 7000 Da, con un límite de exclusión de 20 kDa. Las fracciones de péptidos obtenidos en esta cromatografía son menores de 3500 Da ya que en todos los casos eluyeron después de la cadena A de la insulina. Solo *B. ternifolia* contiene una fracción peptídica mayor de 5000 kDa. Una peculiaridad de la mayoría de los péptidos aquí aislados es que no parecen contener aminoácidos aromáticos en su estructura ya que solo el P1 de *T. globosa* y el P2 y P3 de *B. ternifolia* presentaron absorbancia a 280 nm o en los otros casos la cantidad es muy pequeña y no logra detectarse. En el bioensayo de éstas fracciones utilizando células de espárrago, cada fracción obtenida de cada especie presentó actividad proliferativa pero de diferente intensidad, incluso algunas fracciones inhibieron la proliferación celular, tal es el caso de la fracción P1 de *T. erecta*. Estas fracciones se utilizaron en dos bioensayos pero con células homologas. Uno de los bioensayos cuantifica el crecimiento por incremento del tamaño celular y el otro la división celular a través de cuantificar el peso seco. Si éste se incrementa significa que hubo proliferación celular. En el caso de *B. ternifolia* todas las fracciones incrementaron la proliferación celular en células homologas e incrementaron entre 11-22 % el volumen celular. A

diferencia de *T. erecta* que solo la fracción denominada P3 tuvo un discreto efecto tanto en división celular como en el volumen de las células. En este caso la masa molecular del péptido bioactivo podría ser mayor de 7000 Da. Pues en los experimentos en que la $F_{200\text{ mM}}$ se fraccionó en dos subfracciones la actividad se presentó con la fracción obtenida entre 12,300 y 5000 Da de peso molecular.

Llama la atención que todas las fracciones péptidicas obtenidas de *T. globosa* incrementaron de manera importante el volumen del paquete celular. Aunque la división celular solo es incrementada discretamente por cada uno de ellos.

Desafortunadamente la complejidad y secuencia de aminoácidos de los péptidos solo pudo ser determinada para la fracción denominada P1 de la columna Superdex Peptide 10/300 de GL de *T. globosa*. Esta fracción está constituida por seis péptidos de tamaño entre los 3.5 kDa y 1.5 kDa, de diversa hidrofobicidad, ya que se observaron señales a diferentes tiempos de retención cuando la fracción fue separada con nanoHPLC en una columna de fase reversa. A cada una de estas señales se les determinó el espectro de masas, y se encontraron en el P1 cuatro de seis secuencias para las señales de péptidos identificados, con probabilidad de 100 % en el banco Mascot: Asp-Arg-Val-Tyr-Leu-His-Pro-Phe, Gly-Val-Tyr-Leu-His-Pro-Phe, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu y Gly-Ala-Arg-Arg-Phe-Arg-Arg-Lys, aunque en este trabajo se esperaría que los péptidos presentes no se encontraran en la base de datos. Además de un péptido con probabilidad de 97.99 % Pro-Ser-Lys.

Para determinar la secuencia del péptido del cual no pudo identificarse su secuencia es necesario determinarla a través del método de Edman.

Uno de los péptidos reportados por el servicio de secuenciación es idéntico a leucina encefalina (YGGFL) y el otro, con excepción de un cambio de amino ácido equivalente en la posición cinco, es similar a Angiotensina II (DRVYLHPF). Para los demás péptidos identificados no se encontraron similitudes de secuencia con proteínas registradas en GenBank usando el programa BLAST.

Es necesario ensayar cada uno de los péptidos por separado con el objetivo de determinar si el incremento generado en la proliferación celular es debido a uno solo o a la mezcla de los seis. Además de determinar si los residuos de prolina y tirosina presentan modificaciones post-traduccionales.

En la Figura 32 se puede ver un resumen de los resultados obtenidos tras cada paso de aislamiento y purificación de los medios condicionados de las tres especies utilizadas en este trabajo, con el fin de facilitar su rápida consulta.

Especia de donde se obtuvo el Medio Condicionado Total	Incremento en la proliferación celular de <i>A. officinalis</i>	Fraciones obtenidas con la columna Sephadex A-25	Incremento en la proliferación celular de <i>Asparragus officinalis</i>	Fraciones obtenidas con la utilización de la columna Bio Gel P-10	Incremento en la proliferación celular de <i>Asparragus officinalis</i>
<i>B. ternifolia</i>	12.03%	F1 - 200 mM *	69.80%	P1	-5.92%
		F2 . 400 mM	31.00%		
		F3- 600 mM	39.15%		
		F4 - 800 mM	24.60%		
		F5 - 1.2 M	5.00%		
<i>T. erecta</i>	12.74%	F1- 200 mM *	138.44%	P1	44.42%
		F2 . 400 mM	54.48%		
		F3- 600 mM	43.86%	P2	-24.08%
		F4 - 800 mM	30.89%		
		F5 - 1.2 M	43.86%		
<i>T. globosa</i> *	86.36%	F1 - 200 mM	6.20%	P1	9.48%
		F2- 400 mM	12.66%		
		F3 - 600 mM	18.99%	P2	5.84%
		F4 - 800 mM	6.37%		
		F5 - 1.2 M	8.67%		

Figura 32. Resumen de los resultados obtenidos tras la realización de los bioensayos en los diferentes pasos de fraccionamiento y separación.

Incremento en la proliferación celular de <i>Asparagus officinalis</i>	Fraciones obtenidas tras la separación de las fracciones * en la columna Superdex Peptide GL 10/300	Incremento en la proliferación celular de <i>A. officinalis</i>	Incremento en el volumen de paquete celular de células homologas	Incremento en la proliferación celular de células homologas (Peso seco)
-5.92%	P1	58.84%	22.22%	19.75%
	P2	45.94%	11.11%	30.82%
	P3	14.62%	11.11%	47.48%
	P4	5.47	-1.11%	19.70%
	P5	23.55%	13.33%	30.96%
44.42%	P1	-5.37%	0.00%	-2.85%
-24.08%	P2	3.70%	0.00%	-45.71%
	P3	60.74%	20.00%	24.28%
9.48%	P1	59.91%	83.33%	5.00%
	P2	6.61%	33.33%	4.34%
5.84%	P3	32.64%	50.00%	19.56%
	P4	28.30%	33.33%	19.56%

CONCLUSIONES

- Los medios condicionados de las tres especies utilizadas presentaron actividad mitogénica en las células dispersas de espárrago, y en las células homólogas.
- La actividad mitogénica del MC de *T. globosa* sin fraccionar fue mayor que en cualquiera de las fracciones colectadas durante la purificación.
- Los compuestos que indujeron la proliferación celular en los MC de *T. erecta* y *B. ternifolia*, son de naturaleza peptídica, sin embargo, para asegurar que son péptidos y no proteínas, es necesario realizar el análisis de espectrometría de masas a las fracciones activas.
- Se logró identificar la secuencia de cinco de los seis péptidos presentes en la fracción P1 de la columna Supperdex Peptide 10/300 GL para el MC de *T. globosa*.
- Los péptidos presentes en la fracción P1 de la columna Superdex Peptide 10/300 GL del MC de *T. globosa* incrementan el tamaño celular (aumento del volumen celular) y la acumulación de biomasa del cultivo homólogo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wilson S y Roberts S. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J* 2012; **10**:249–268.
2. Kroymann J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 2011; **14**:246–251.
3. Cragg G, Boyd M, Cardellina J, Grever M, Schepartz S, Snader K y Suffness M. The search for new pharmaceutical crops: drug discovery and development at the National Cancer Institute, Proceedings Second National Symposium of New Crops. In *New Crops*. Edited by Janick J, Simon JE. 161-167. New York, USA: John Wiley & Sons, Enero 1993.
4. Fulzele P. Bioreactor for production of bioactive compounds. *IANCAS Bull* 2005; **4**:35-42.
5. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res* 2009; **3**:1222-1239.
6. Ryan C, Pearce G, Scheer J y Moura D. Polypeptide Hormone. *Plant Cell* 2002; **14**:S251–S264.
7. Fukuda H y Higashiyama T. Diverse Functions of Plant Peptides: Entering a New Phase. *Plant Cell Physiol* 2011; **52**:1–4.
8. Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M y Matsubayashi Y. Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis. *PNAS* 2007; **104**:18333–18338.
9. Higashiyama F. Diverse functions of plant peptides: entering a new phase. *Plant Cell Physiol* 2011; **52**:1-4.
10. Matsubayashi Y. Posttranslationally Modified small-peptide signals in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2014; **65**:385-413
11. Matsubayashi Y. Recent progress in research on small post translationally modified peptide signals in plants. *Genes Cells* 2012; **17**:1–10.

12. Farrokhi N y Brusslan J. Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnol J* 2008; **6**:105–134.
13. Matsubayashi Y. Post-translational modifications in secreted peptide hormones in plants. *Plant Cell Physiol* 2011; **52**:5-13.
14. Komori R, Amano Y, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y. Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* 2009;**106**:15067–15072.
15. Hieta R, Myllyharju J. Cloning and characterization of a low molecular weight prolyl 4-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana*: effective hydroxylation of proline-rich, collagen-like, and hypoxia-inducible transcription factor α -like peptides. *J Biol Chem* 2002;**277**:23965–23971.
16. Kelly L. Gorresa and Ronald T. Rainesa. Prolyl 4-hydroxylase. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010;**45(2)**:106–124.
17. Egelund J, Obel N, Ulvskov P, Geshi N, Pauly M. Molecular characterization of two *Arabidopsis thaliana* glycosyltransferase mutants, rra1 and rra2, which have a reduced residual arabinose content in a polymer tightly associated with the cellulosic wall residue. *Plant Mol Biol* 2007;**64**:439–451.
18. Stuart R. y Street H. Studies on the Growth in Culture of Plant Cells: IV. The initiation of division in suspensions of stationary phase cells of *Acer pseudoplatanus* L. *J Exp Bot* 1969: **20**:556-571.
19. Hanai H, Matsuno T, Yamamoto M, Matsubayashi Y, Kobayashi T, Kamada H, y Sakagami Y. A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiol* 2000;**41**:27–32.
20. Shinohara H, Ogawa M, Sakagami Y, Matsubayashi Y. Identification of ligand binding site of phytosulfokine receptor by on-column photoaffinity labeling. *J Biol Chem* 2007;**282**:124–131.
21. Matsubayashi Y y Sakagami Y. Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci* 1996; **93**:7623-7627.

22. Matsubayashi Y, Tagaki L, Sakagami Y. Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high- and low-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:13357-13362.
23. Matsubayashi Y, Takagi L, Omura N, Morita A, Sakagami Y. The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- α stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of Zinnia. *Plant Physiol* 1999; **120**:1043-1048.
24. Hanai H, Matsuno T, Yamamoto M, Matsubayashi Y, Kobayashi T, Kamada H, y Sakagami Y. A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiol* 2000;**41**:27–32.
25. Hanai H, Nakayama D, Yang H, Matsubayashi Y, Hirota Y y Sakagami Y. Existence of a plant tyrosylprotein sulfotransferase: Novel plant enzyme catalyzing tyrosine *O*-sulfation of preprophytosulfokine variants in vitro. *FEBS Lett* 2000;**470**:97–101.
26. Yang G, Shen S, Kobayashi T, Matsubayashi Y, Sakagami Y y Kamada H. Stimulatory effects of a novel peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α on the adventitious bud formation from callus of *Antirrhinum majus*. *Plant Biotech* 1999;**16**: 231–234.
27. Yamakawa S, Sakuta C, Matsubayashi Y, Sakagami Y, Kamada H y Satoh S. The promotive effects of a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- α . On the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. *J Plant Res* 1998;**111**: 453–458.
28. Igarashi D, Tsuda K y Katagiri F. The peptide growth factor, phytosulfokine, attenuates pattern-triggered immunity. *Plant J* 2012;**71**:94–204.
29. Markus A. Peptides as triggers of plant defence. *J E Bot* 2013;**7**:1-11.
30. Mosher S, Seybold H, Rodriguez P. The tyrosinesulfated peptide receptors PSKR1 and PSY1R modify the immunity of Arabidopsis to biotrophic and necrotrophic pathogens in an antagonistic manner. *Plant J* 2013;**73**:469–482.

31. Amano Y, Tsubouchi H, Shinohara H, Ogawa M y Matsubayashi Y. Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis. *PNAS* 2007;**104**; 18333–18338.
32. Matsuzaki Y, Ogawa-Ohnishi M, Mori A y Matsubayashi Y. Secreted Peptide Signals Required for Maintenance of Root Stem Cell Niche in *Arabidopsis*. *Science* 2010;**329**:1065-1067.
33. Butenko M, Vie A, Brembu T, Aalen R y Bones A. Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Trends Plant Sci* 2009;**14**; 255–263.
34. Marshall E, Costa L y Gutierrez M. Cysteine-rich peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development. *J Exp Bot* 2011;**62**:1677–1686.
35. Yamaguchi Y y Huffaker A. Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 2011;**14**:351–357.
36. Kazuo Sasaki, Tatsuaki Ishise, Koichiro Shimomura,, Toshihiro Kobayashi, Yoshikatsuo Matsubayashi, Youji Sakagami, Hironori Umetsu y Hiroshi Kamada. Effects of phytosulfokine- α on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of *Atropa belladonna*. *Plant Growth Regul* 2002;**36**:87-90.
37. Kim B, Gibson D y Shuler M. Effect of the plant peptide regulator, Phytosulfokine- α , on the growth and taxol production from *Taxus sp.* suspension cultures. *Biotechnol Bioeng* 2006;**95**:8-14.
38. Onrubia M, Pollier J, Vanden R, Goethals M, Gevaert K, Moyano E, Vidal-Limon H, Cusid R, Palazón J y Goossens A. Taximin, a conserved plant-specific peptide is involved in the modulation of plant-specialized metabolism. *Plant Biotechnol J* 2014;**12**; 971–983.
39. Wu H, Johnson M, Lu C, Fritsche K, Thomas A, Lai Y, Cai Z y Greenlief C. Peptidomics study of anthocyanin-rich juice of elderberry. *Talanta* 2015:131:640–644.
40. Vijldera T, Valkenborga D, Dewaelee D, Remmeriea N, Laukensf K y Witters E. A generic approach for “shotgun” analysis of the soluble proteome of plant cell suspension cultures. *J Chromatogr B Biomed Appl* 2015:927;48-56.

41. Jolad S, Hoffmann J, Torrance S, Wiedhopf R, Cole J, Arora S, Batesm R, Gargiulo R y Kriek G. Bouvardin and Deoxybouvardin, antitumor cyclic hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae), *J Am Chem Soc* 1977; **99**:8040-8044.
42. Tobey R, Orlicky D, Deaven L, Rail L y Kissane R. Effects of Bouvardin (NSC 259968), a cyclic hexapeptide from *Bouvardia ternifolia*, on the progression capacity of cultured Chinese hamster cells. *Cancer Res* 1978; **38**:4415-4421.
43. Moeller S, Jacques P, Blumberg J. The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *J Am Coll Nutr* 2000;**19**:5228– 5273.
44. Krinsky N, Landrum J, Bone R. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu Rev Nutr* 2003;**23**:171–201.
45. F. Zavala-Chávez¹; M. Soto-Hernández²; Ma. T. Rodríguez-González. El romerillo (*Taxus globosa* Schlecht.): biología, dificultades y perspectivas de su uso. *Rev. Chapingo ser. hort.* 2001;7(1): 77-94.
46. Guéritte-Voegelein F, Guénard D, Potier P. Determination of taxol in the extract of *taxus chinensis* by reversed phase HPLC. *J Nat Prod.* 1987;50(1);9-18.
47. Vorum and Blum procedures: <http://www.protana.com/PDF/ASMS/PosterSilverstain.pdf> presented at 48th American Society for Mass Spectrometry Conference on Mass Spectrometry June 11-15 2000, Long Beach, CA, poster TPE 191.

ANEXO

1. Curva estándar de ácido bicinchonínico

El método del ácido bicinchonínico (BCA) permite la cuantificación de proteínas dentro del rango de 0.5 µg/ml a 1.2 mg/ml, por lo cual decidimos utilizarlo, ya que las concentraciones de proteínas obtenidas tras el fraccionamiento de los medios condicionados son muy pequeñas y este método era el que nos permitía cuantificarlas. Sin embargo, tuvimos el inconveniente de que los azúcares reductores interferían con la reacción y es posible que tras la extracción de las proteínas de los medios condicionados con fenol, pudiéramos arrastrar azúcares presentes per se en los medios.

El fundamento del método se basa en que el Cu^{2+} es reducido a Cu^{1+} en presencia de las proteínas y en un pH alcalino, este Cu^{1+} es quelado por el ácido bicinchonínico y se forma un complejo de color púrpura. En la Figura 33 se muestra la curva estándar de BSA determinada por el método de BCA utilizada para la determinación del contenido de proteínas de todas las muestras.

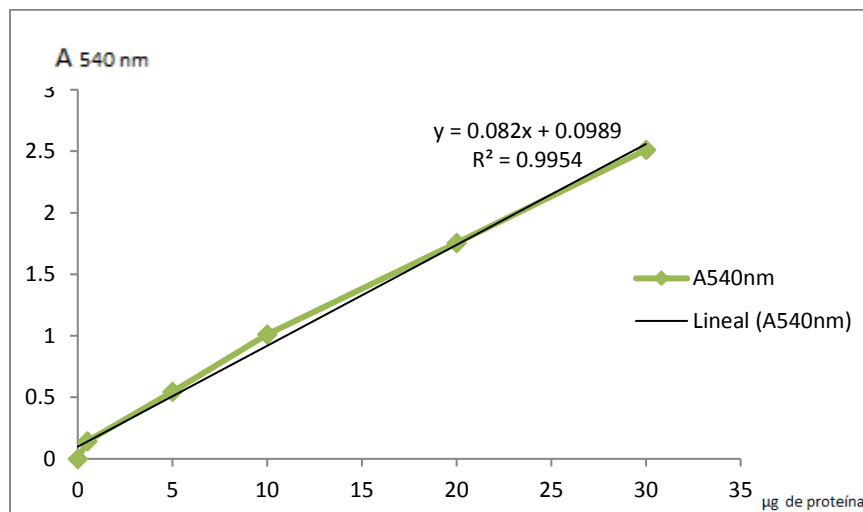


Figura 33. Curva estándar de BSA para la determinación de proteína con el método del ácido bicinchonínico.

Para calcular la cantidad de proteína en cada fracción se utilizó la siguiente ecuación obtenida de la Figura 33.

$$C = \frac{A - 0.0989}{0.082}$$

Dónde:

C es la cantidad de proteína en µg

A es la absorbancia de la muestra a 540 nm

2. Curva estándar de glucosa para la determinación de carbohidratos

De la parte lineal de la curva estándar (Figura 34) se tiene que 1 μg de glucosa absorbe 0.0178 a 945 nm.

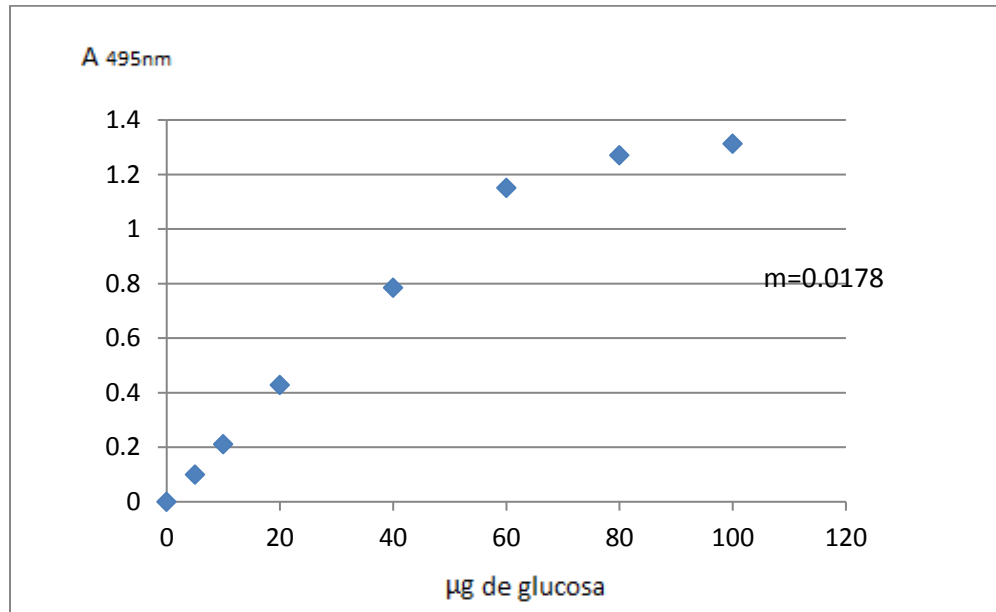


Figura 34. Curva estándar para la determinación de carbohidratos.

3. Curvas de crecimiento de *B. ternifolia* y *T. erecta*

Para poder llevar a cabo el ensayo de la actividad de los componentes del medio condicionado que mostraron actividad en el sistema de células dispersas de espárrago, se realizaron curvas de crecimiento de *T. erecta* y *B. ternifolia*. El crecimiento se midió como aumento en el volumen de paquete celular (Figura 35 y 36).

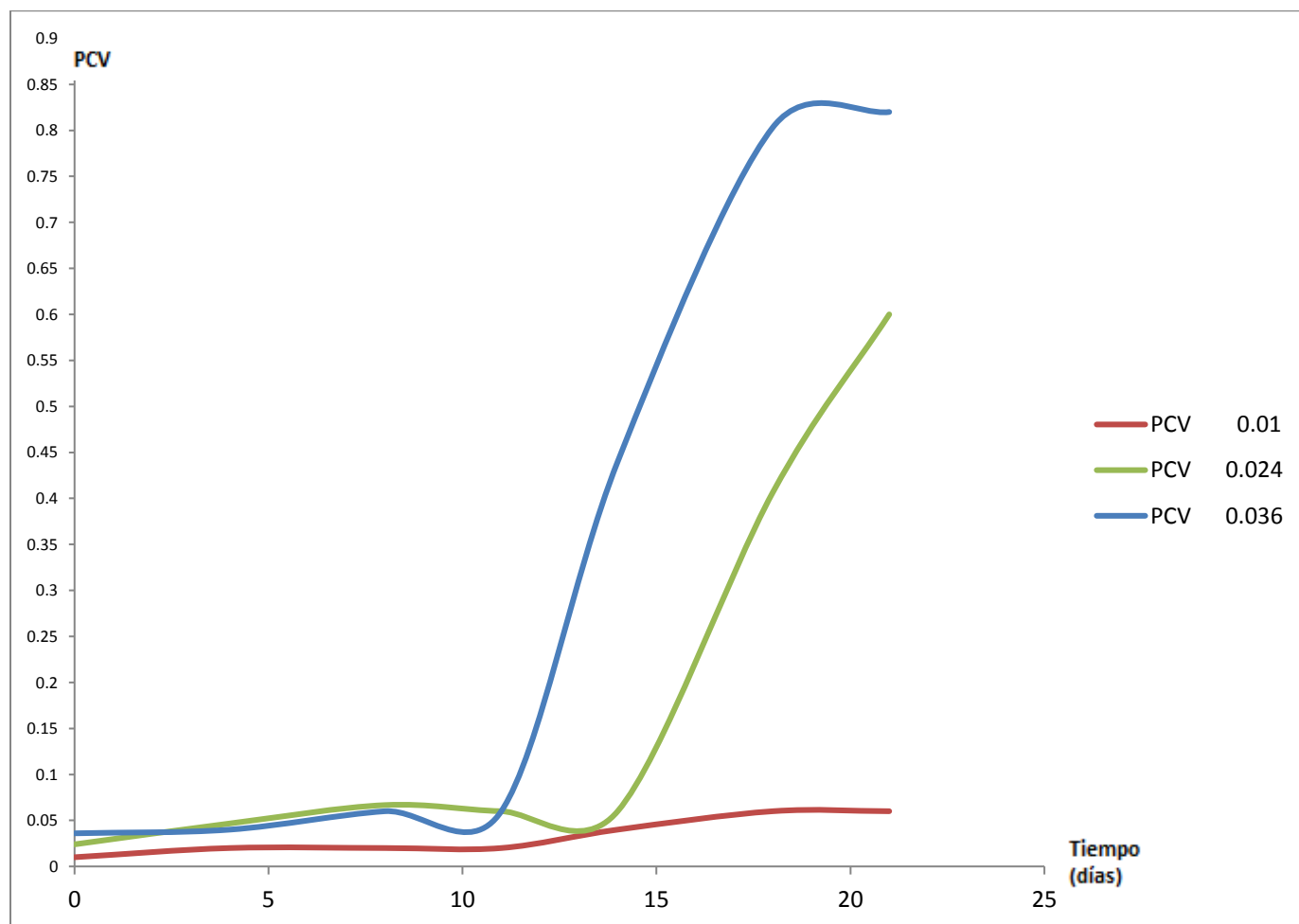


Figura 35. Cinética de crecimiento de *T. erecta* obtenida a partir de la medición del incremento del Volumen de Paquete Celular.

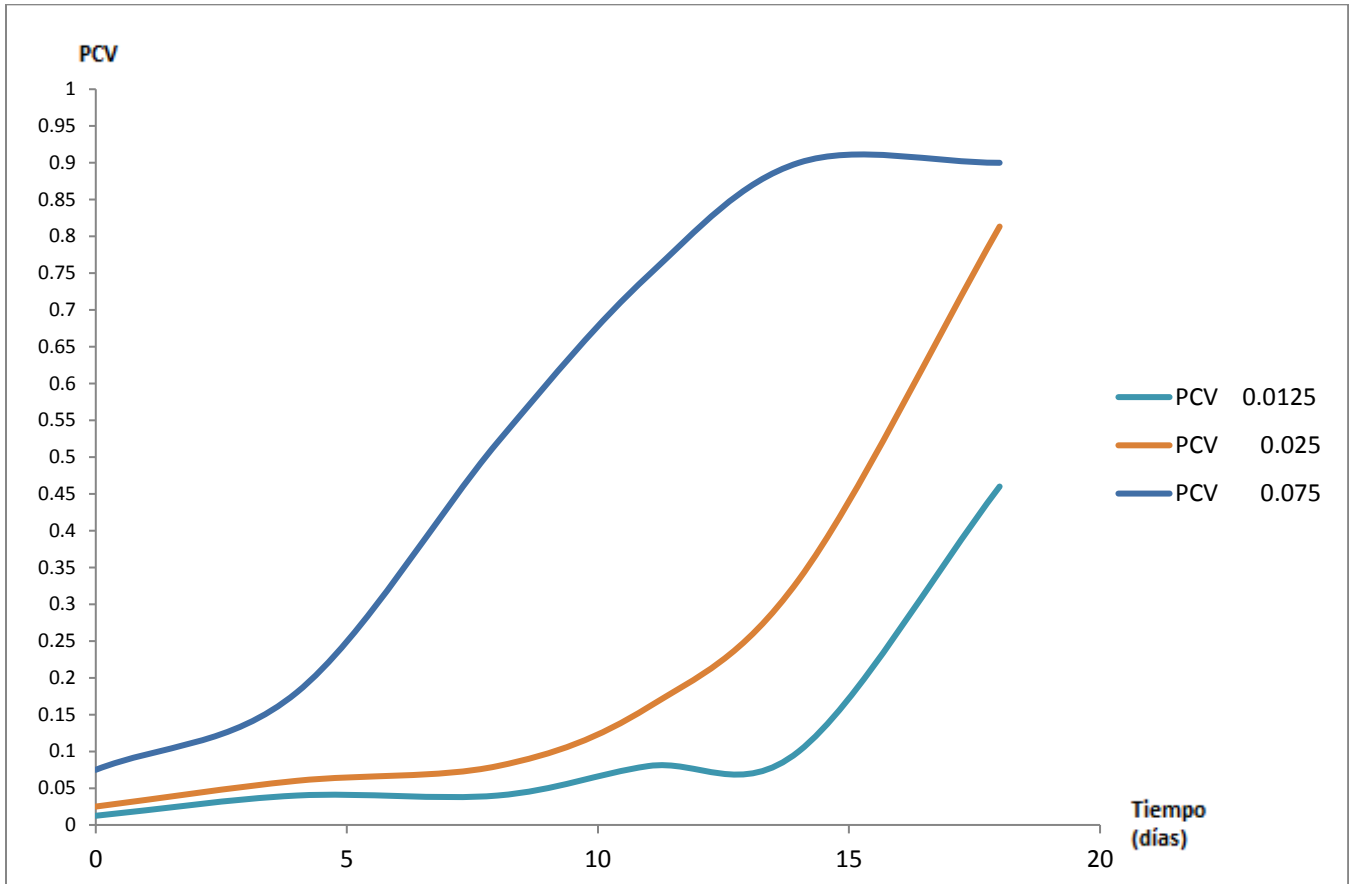


Figura 36. Cinética de crecimiento de *B. ternifolia* obtenida a partir de la medición del incremento del Volumen de Paquete Celular.

4. Análisis de huella peptídica

A partir de las fracciones eluidas de la columna Superdex Peptide 10/300 GL que presentaron actividad mitogénica, se analizó mediante la técnica de HPLC-MS la huella peptídica presente en éstas a través del siguiente procedimiento. A las fracciones liofilizadas se les añadió para la digestión 30 μ l de solución de tripsina porcina modificada cuya composición es: 20 ng/ μ l (promega, Madison, WI, USA) en 50 mM de bicarbonato de amonio seguido de una incubación durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos se extrajeron con 50% (v/v) de acetonitrilo 5% (v/v) en ácido fórmico dos veces por 30 min con sonicación. El volumen de los extractos fue reducido mediante evaporación en una centrífuga de vacío y se ajustaron a 20 μ l con 1% (v/v) de ácido fórmico. Posteriormente los péptidos fueron desalados y concentrados por Ziptip C18 y eluidos en 12 μ l de fase móvil (3% acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico) para posteriormente ser analizados por espectrometría de masas.

El análisis espectrométrico de masas de los péptidos tripticos se llevó a cabo utilizando un sistema integrado nano-LC_ESI_MS/MS (quadrupole/time of flight, synapt G2 high definition mass spectrometer, Waters Corporation) equipado con una fuente de ion NanoLockSpray. El instrumento está acoplado en línea a un NanoAcquity Ultra Performance liquid chromatograph (UPLC), (Waters Corporation). El sistema de solventes binario que se utilizó es 2% de acetonitrilo en agua Milli Q con 0.1% de ácido fórmico (fase móvil A) y 98% de acetonitrilo en agua Milli Q con 0.1% de ácido fórmico (fase móvil B). Las muestras fueron concentradas y desaladas por inyección en una columna de captura simétrica C18 UPLC (5 μ m, 180 μ m, x 20 mm, Waters Corporation) y se lavó con 100% de fase móvil A a una velocidad de flujo de 15 μ l / min, después de 3 min, se cambió la columna de captura en línea con una columna analítica.

Los péptidos se separaron en una columna BEH, C18 UPLC (1.7 μ m, 75 μ m x 100 mm, Waters Corporation) mediante un gradiente lineal de 40% de fase B en un período de 30 min a una velocidad de flujo de 0.3 μ l /min, seguido por un lavado de 98% de fase móvil B. El espectrómetro de masas fue calibrado con una solución de NaCsL y operado en modo ESI V positivo a una resolución de 10000 total ancho y mitad de altura (fwhh). Los espectros se adquirieron en modo automático utilizando data-dependent acquisition (DDA). La solución se infundió con [Glu] fibrinopéptido B (100 fmol/ μ l) a través del sprayer de referencia de la fuente del NanoLockSpray con una velocidad de flujo de 500 nL/min y se aplicó en intervalos de 30 segundos durante la adquisición. El sondeo del scan MS de un segundo sobre el rango m/z 300-1600 se empleó para la detección de péptidos seguido por 2 scans MS/MS de 2 segundos cada uno (m/z 50-2000) para detectar precursores.

La energía de colisión se ajustó automáticamente con base en el estado de carga del ion y la masa. Los 5 iones precursores más intensos se analizaron por cambio de evento MS/MS. Se utilizó la dinámica de exclusión por 60 segundos para minimizar eventos múltiples de MS/MS del mismo precursor.

El procesamiento de datos e identificación de proteínas se realizó de la siguiente forma: Las filas de datos de DDA se procesaron y convirtieron a archivos Pkl utilizando el servidor global ProteinLynx versión 2.4 mejorada y el software (PLGS) (Waters Corporation). Se realizaron búsquedas en UNIPROT para lo cual se utilizó a la tripsina como proteasa específica, las pérdidas de escisión se dejaron con tolerancias de masa de 50 ppm y 0,05 Da para el ion precursor y el fragmento respectivamente. Las modificaciones postraduccionales incluyeron la oxidación de metionina y la desaminación -glutamina y asparagina. Los péptidos que coincidieron con las puntuaciones PLGS que excedían el nivel del 95 % de confianza fueron aceptados como correctos. La puntuación del ion es de $-10 * \text{Log}(P)$ donde P es la probabilidad de que el ion fragmentado que se observa es un evento aleatorio. El umbral de puntuación en las condiciones anteriores fue de 52 para $p < 0,05$. Los archivos Pkl se pueden subsecuentemente correr en el banco de datos por el algoritmo rastreador de MASCOT (Version 1.6b9, Matrix science, London, UK disponible en <http://www.matrixscience.com>).