

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

**Producción de compuestos hipoglucemiantes en cultivos de células  
en suspensión de *Cecropia obtusifolia* (Bertol) “guarumbo”**

**T E S I S**

para obtener el grado de  
Doctora en Biotecnología

**P R E S E N T A**

M. en B. María del Pilar Nicasio Torres

**Director**

Dr. Francisco Cruz Sosa

Julio / 2009

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el Convenio 471-01 Doctorado en Biotecnología”.

La M. en B. María del Pilar Nicasio Torres recibió la beca de CONACYT con número de registro 181150.

El desarrollo de la tesis contó con financiamiento del Instituto Mexicano del Seguro Social:  
FOFOI-2004/077.

México D.F. a 27 de julio del 2009

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Producción de compuestos hipoglucemiantes en cultivos de células en suspensión de  
*Cecropia obtusifolia* (Bertol) “guarumbo”**

que presentó

M. en B. María del Pilar Nicasio Torres

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesor: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Asesor: Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez

**Jurado:**

Presidente: Dra. Florina Ramírez Vives

Secretario: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Vocal: Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez

Vocal: Dra. Mariana Meckes Fischer



## *Agradecimientos*

*Al Dr. Francisco Cruz Sosa, por la oportunidad, el apoyo y la confianza brindados durante todo este tiempo. Por las palabras de animo aunque el estuviera intranquilo. Por el inicio de nuevas desafíos, Doctor Cruz, en este momento es Alejandro pero la lista comienza.*

*Con profundo cariño y respeto mi agradecimiento a la Dra. Mariana Meckes Fischer, por ser la base en mi incursión en este camino, por transmitirme su entusiasmo y entrega en la investigación, por el respeto y compromiso que toma en cada actividad que inicia y concluye. Al ser humano que me ha permitido compartir facetas importantes de su vida.*

*A la Dra. María Luisa Garduño por su disposición y apoyo en esta trayectoria. Gracias por sus consejos, sugerencias y entusiasmo al lograr concluir este ciclo académico que iniciamos.*

*Al Dr. Víctor Chávez por su apoyo, sugerencias, confianza y entusiasmo de siempre. Gracias por sus palabras de admiración, de reconocimiento y de estímulo para continuar progresando académicamente.*

*A la Dra. Lucía Aguilar Santamaría (Lucy) por todo lo compartido durante la colecta del material vegetal y el apoyo en las evaluaciones biológicas.*

*A la Dra. Yolanda Pérez Ferán por su disposición y ayuda en la revisión de la redacción del escrito.*

*A mis estudiantes: Ceci, Sharon, Nayelly, Juanita, Juan Carlos, Adriana, Ada, Juanita, Briss, Benito†, Saúl, Alejandro, Patty, Maricela, Alejandro y David, por permitirme ser parte de sus enseñanzas y a la vez de mi aprendizaje.*

## *Reflexiones*

*Mis búsquedas en la vida se resumen en estas frases:*

*Deseo entender y aplicar las cualidades del lápiz:*

*Primera: poder hacer grandes cosas, pero no debo olvidar nunca que existe una mano que guía mis pasos. A esa mano la llamo Dios y Éste debe conducirme siempre en la dirección de su voluntad.*

*Segunda: de vez en cuando necesito dejar de escribir y usar el sacapuntas. Con eso el lápiz sufre un poco, pero al final está más afilado. Por tanto, he de saber soportar algunos dolores, porque me harán ser una persona mejor.*

*Tercera: el lápiz siempre permite que use una goma para borrar los errores. Debo entender que corregir una cosa que he hecho no es necesariamente algo malo, sino algo importante para mantenerme en el camino de la justicia.*

*Cuarta: lo que realmente importa del lápiz no es la madera ni su forma exterior, sino el grafito que lleva dentro. Por tanto, cuido siempre lo que ocurre dentro de mí.*

*Quinto: siempre deja una marca. Del mismo modo, he de saber que todo lo que haga en la vida dejará huellas y procurar ser consciente de todas mis acciones.*

*Paulo Coelho*

*Y al mismo tiempo dejarme fluir y disfrutar la vida*

*“Ser como el río que fluye, silencioso en medio de la noche.  
No temer las tinieblas de la noche. Si hay estrellas en el cielo, reflejarlas.  
Y, si los cielos se cubren de nubes, como el río, las nubes son agua;  
reflejarlas también sin pena en las profundidades tranquilas”*

*Manuel Bandeira*

*Y entender que todo lo que desee lo puedo lograr*

*“Un niño siempre puede enseñar tres cosas a un adulto: a ponerse contento sin motivo, a estar siempre ocupado con algo y a saber exigir con todas sus fuerzas aquello que desea”*

*Paulo Coelho*

*Este periodo también fue de gran búsqueda y tuve la oportunidad de crecer internamente y permitirme vivir una de las experiencias más bellas de mi vida que deseo perdure hasta responder a la pregunta ante el creador.*

### *¿Cómo he amado?*

*A mi querida y maravillosa familia: padres, hermanos, en especial a mi hermano Alejandro† por su fortaleza y fe alcanzada, cuñados y sobrinos, por sus muestras de admiración y amor.*

*Al hombre que amo, Héctor, por acompañarme en esta trayectoria.*

*A mis queridos amigos Nichole y Michelle† por todo el cariño y atenciones recibidas durante mi estancia en Amiens Francia, y los grandiosos detalles de siempre para mí y mi familia.*

*A mes chers amis Nichole et Michelle† par toute l'affection et attentions reçues pendant mon séjour à Amiens France, et les détails grandioses de toujours pour moi et ma famille.*

*Con mucho cariño a mi amigo Lalo, Dr. Eduardo Aranda Escobar†, por el apoyo ofrecido desde que nos conocimos, por sus enseñanzas, por las actividades y compromisos iniciados juntos. Porque cuando Pily y yo nos comprometemos con un estudiante, termina la tesis y se titula: por Juanita, Adriana, Juanita, Ada y Patty.*

*A mis extraordinarias amigas con quienes he compartido momentos maravillosos y tristes de nuestras vidas: Lily, Guille, Paty, Faby, Pat, Marianita y Sandy.*

*A mis amigos: Maribel, Mirna, Meto, Martha, Ireneo, Daniel, Víctor, Gaby, Sanaa, Gérald, Aisha, Lamine, Lucy, Juan Manuel†, Juan Carlos, Gustavo, Iris, Irma, Sergio y Memo, por los momentos compartidos en diferentes etapas de mi vida.*

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
1. Diabetes mellitus (DM)	4
2. La herbolaria mexicana en el tratamiento de la DM2	7
3. <i>Cecropia obtusifolia</i> (Bertold)	8
3.1. Clasificación taxonómica	8
3.2. Sinonimia botánica	8
3.3. Sinonimia popular	8
3.4. Localización geográfica de la especie	9
3.5. Descripción botánica	9
3.6. Aspectos fisiológicos de la planta	12
3.7. Usos medicinales	13
3.8. Actividad hipoglucemiante de extractos de hojas	13
3.8.1. Estudios en animales de experimentación	13
3.8.2. Estudios clínicos	15
3.9. Toxicidad de extractos de hojas	16
4. La biotecnología como herramienta para la producción del	16

material vegetal	
5. Metabolismo secundario	17
5.1. Biosíntesis de compuestos fenólicos	18
5.1.1. Biosíntesis del ácido clorogénico (AC)	18
5.1.2. Biosíntesis de isoorientina (ISO)	20
6. Metabolitos secundarios en los cultivos de tejidos vegetales	20
6.1. Reducción del contenido de nitratos en los cultivos de células en suspensión	23
6.2. La micropropagación de plantas medicinales	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	28
1. Objetivo General	28
2. Objetivos Particulares	28
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Colecta e identificación taxonómica del material vegetal	29
2. Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i>	29
2.1. Preparación del cultivo aséptico	29
2.2. Germinación de semillas del árbol silvestre	31
2.3. Calogénesis	31
2.3.1. Cultivos morfogénéticos	32
2.4. Micropropagación	32
2.4.1. Elongación y enraizamiento de los brotes	32

2.4.2. Endurecimiento y aclimatización de las plántulas	33
2.5. Cultivo de células en suspensión	33
2.5.1. Cinéticas de crecimiento	34
2.5.2. Optimización de las condiciones de cultivos en suspensión	34
2.5.2.1. Concentración del inóculo	34
2.5.2.2. Concentración de nitratos en el medio	34
3. Análisis de los metabolitos secundarios por HPLC	35
3.1. Obtención de extractos metanólicos	35
3.2. Condiciones para el análisis por HPLC	35
4. Actividad hipoglucemiante de los productos	36
4.1. Determinación de los niveles de glucosa sérica	37
VII. RESULTADOS	38
1. Colecta e identificación taxonómica del material vegetal	38
2. Establecimiento de los cultivos <i>in vitro</i>	38
2.1. Preparación del cultivo aséptico	38
2.2. Germinación de semillas del árbol silvestre	39
2.3. Calogénesis	40
2.4. Cultivo de callos morfogénéticos	43
2.5. Elongación y enraizamiento de los brotes	44
2.6. Endurecimiento y aclimatización de las plántulas	45
2.7. Cultivo de células en suspensión	47
2.7.1. Optimización de las condiciones de cultivo	47
2.7.1.1. Concentración del inóculo	47

2.7.1.2. Concentración de nitratos en el medio	49
3. Análisis del contenido de los metabolitos secundarios	51
3.1. Referencias de AC e ISO	51
3.2. Concentraciones de AC e ISO en los cultivos de callos	52
3.3. Concentraciones de AC e ISO en los cultivos en suspensión	54
3.3.1. Efecto de la concentración del inóculo sobre la producción de AC e ISO en los cultivos celulares	55
3.3.2. Efecto de la concentración de nitratos sobre la producción de AC e ISO en los cultivos celulares	57
3.4. Concentraciones de AC e ISO en las plantas	59
4. Efecto hipoglucemiante de los productos	61
4.1. Actividad de los extractos de las plantas	61
4.2. Actividad hipoglucemiante y contenido de AC e ISO en los extractos de las plantas	62
4.3. Actividad de los extractos de células en suspensión	63
VIII. DISCUSIÓN	65
IX. CONCLUSIONES	70
X. PERSPECTIVAS	72
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Metabolitos secundarios y compuestos <i>de novo</i> producidos en cultivos de células en suspensión de plantas.	25
Tabla 2. Parámetros de crecimiento de las plantas de <i>C. obtusifolia</i> micropropagadas.	46
Tabla 3. Constantes cinéticas de los cultivos de células en suspensión de <i>C. obtusifolia</i> obtenidos con inóculos del 4% y 5% en peso fresco (PF).	49
Tabla 4. Constantes cinéticas de los cultivos de células en suspensión de <i>C. obtusifolia</i> en medio MS complementado con distintas concentraciones de nitratos.	51
Tabla 5. Efecto de las auxinas en la acumulación del AC en los cultivos de callos derivados de explantes de hoja del árbol aclimatado de <i>C. obtusifolia</i> .	53
Tabla 6. Efecto de las auxinas y el tipo de explante en la acumulación de AC en los cultivos de callos de <i>C. obtusifolia</i> .	54
Tabla 7. Concentraciones de AC e ISO en los árboles y las plantas de <i>C. obtusifolia</i> .	61
Tabla 8. Contenido de AC e ISO y efecto hipoglucemiante de los extractos de las plantas <i>C. obtusifolia</i> .	63
Tabla 9. Contenido de AC e ISO y efecto hipoglucemiante de extractos de células en suspensión de <i>C. obtusifolia</i> en medio MS con concentraciones variables de nitratos.	64

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Árbol de <i>C. obtusifolia</i> “guarumbo” en su hábitat natural.	10
Figura 2. Características de las hojas, pecíolos e inflorescencias de <i>C. obtusifolia</i> .	11
Figura 3. Características de los frutos y semillas de <i>C. obtusifolia</i> .	12
Figura 4. Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de las hojas de <i>C. obtusifolia</i> .	14
Figura 5. Ruta del ácido shiquímico.	19
Figura 6. Biosíntesis de fenoles.	21
Figura 7. Diagrama de establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> , análisis químico y evaluación biológica.	30
Figura 8. Material de <i>C. obtusifolia</i> colectado en Cunduacán, Tabasco.	38
Figura 9. Árbol de <i>C. obtusifolia</i> aclimatado en el Estado de Morelos.	39
Figura 10. Germinación de semillas de <i>C. obtusifolia</i> en diferentes condiciones de tratamiento e incubación.	40
Figura 11. Efecto de las auxinas sobre el crecimiento de los callos de explantes de hoja del árbol aclimatado de <i>C. obtusifolia</i> después de 8 semanas de cultivo.	41
Figura 12. Efecto de las auxinas sobre el crecimiento en peso fresco (a) y seco (b) de callos después de 4 y 8 semanas de cultivo derivados de explantes de hoja del árbol aclimatado de <i>C. obtusifolia</i> .	42
Figura 13. Cultivos de callos derivados con diferentes auxinas (13.38 $\mu$ M) a partir de explantes de hoja del árbol aclimatado de <i>C. obtusifolia</i> .	43
Figura 14. Efecto de las auxinas 2,4-D y ANA sobre la respuesta morfogénica de los explantes de plántulas de <i>C. obtusifolia</i> después de 8 semanas de cultivo.	44
Figura 15. Plántulas de 2 meses obtenidas a partir de los brotes desarrollados en explantes de tallo con ANA (8.92 $\mu$ M) en combinación con BAP (2.22 $\mu$ M).	45
Figura 16. Proceso de aclimatización de las plántulas de <i>C. obtusifolia</i> .	46

Figura 17. Cultivo de células en suspensión de <i>C. obtusifolia</i> empleando un inóculo del 5% de callos derivados de explantes de hoja con 2,4-D (8.92 $\mu$ M) y BAP (2.22 $\mu$ M).	47
Figura 18. Cinéticas de crecimiento del cultivo de células en suspensión de <i>C. obtusifolia</i> a partir de inóculos del 4 % y 5 % en peso fresco iniciados con callos derivados de explantes de hoja del árbol aclimatado.	48
Figura 19. Cinéticas de crecimiento de las células en suspensión con distintas concentraciones de nitratos en el medio MS.	50
Figura 20. Perfil cromatográfico ( $\lambda$ = 254 nm) de los estándares comerciales de AC e ISO.	51
Figura 21. Perfil cromatográfico ( $\lambda$ = 254 nm) del extracto metanólico de un cultivo de callo de <i>C. obtusifolia</i> .	52
Figura 22. Perfil cromatográfico ( $\lambda$ = 254 nm) del extracto metanólico del cultivo de células en suspensión de <i>C. obtusifolia</i> .	55
Figura 23. Cinéticas de crecimiento celular y acumulación de AC en los cultivos en suspensión de <i>C. obtusifolia</i> con un inóculo del 4%.	56
Figura 24. Cinéticas de crecimiento celular y acumulación de AC en los cultivos en suspensión de <i>C. obtusifolia</i> con un inóculo del 5%.	57
Figura 25. Cinéticas de producción del compuesto AC en cultivos celulares de <i>C. obtusifolia</i> con concentraciones variables de nitratos en el medio MS.	58
Figura 26. Cinéticas de producción del compuesto ISO en cultivos celulares de <i>C. obtusifolia</i> con concentraciones variables de nitratos en el medio MS.	59
Figura 27. Perfil cromatográfico ( $\lambda$ = 254 nm) de los extractos metanólicos de hojas de árboles y plantas de <i>C. obtusifolia</i> : silvestre (a), aclimatada (b) y micropropagada (c).	60
Figura 28. Efecto de los extractos de las plantas de <i>C. obtusifolia</i> sobre los niveles de glucosa sérica en ratones normoglucémicos.	62
Figura 29. Efecto de los extractos de células en suspensión de <i>C. obtusifolia</i> en medio MS con concentraciones variables de nitratos sobre los niveles de glucosa sérica en ratones normoglucémicos.	64

## ABREVIATURAS

AC	Ácido clorogénico
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
ANOVA	Análisis de varianza
ADP	Difosfato de adenina
ATP	Trifosfato de adenina
BAP	Bencilaminopurina
BS	Biomasa seca
CIBIS	Centro de Investigación Biomédica del Sur
CHS	Chalcona sintasa
C4H	Cinamato 4 hidroxilasa
C3H	Cumarato 3 hidroxilasa
4CL	Hidroxicinamato CoA ligasa
COMT	Ácido caféico 3-O-metiltransferasa
Conabio	Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad
DAHP	3-deoxi-D-arabino-heptuloso-7 fosfato
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva 50
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal 50
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMS	Diferencia Mínima Significativa
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoacético

ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EPSP	Enolpiruvil-shiquimato-fosfato sintasa
FDA	Food and Drug Administration
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
HQT	Hidroxicinamoil-CoA quinato transferasa
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
Herbario IMSSM	Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social de México
INBio	Instituto Nacional de Biodiversidad
ISSO	Isoorientina
MS	Murashige y Skoog
NA	No fue analizado
NADPH	Dinucleótido de adenina-nicotinamida fosfato reducido
NCSS	Number Cruncher Statistical Software
ND	No hubo desarrollo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAL	Fenilalanina amonioliasa
PDT	Podofilotoxina
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales

## RESUMEN

*Cecropia obtusifolia*, popularmente conocida como “guarumbo”, es un árbol medicinal que se utiliza en México para el control de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). La investigación de esta especie, tanto a nivel experimental en animales de laboratorio como en el humano, ha demostrado las propiedades antidiabéticas que posee el vegetal, las cuales son atribuidas a los compuestos fenólicos ácido clorogénico (AC) e isoorientina (ISO). El presente estudio tuvo como objetivo establecer las condiciones *in vitro* para la propagación masiva de las plantas de *C. obtusifolia* y para el desarrollo de los cultivos de células en suspensión que conserven la capacidad de producción de los compuestos bioactivos de la planta AC e ISO.

Para lo anterior, a partir de explantes de hoja de plantas aclimatadas se establecieron cultivos de callos en medio Murashige y Skoog (MS) empleando diferentes niveles de auxinas; la mejor respuesta se obtuvo utilizando 8.92  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en combinación con 2.22  $\mu\text{M}$  de bencilaminopurina (BAP). En una etapa posterior, los explantes de hoja, tallo, hipocótilo y cotiledón derivados de plántulas *in vitro*, desarrollaron callos rizogénicos con 2,4-D; en tanto que los explantes de hoja, hipocótilo y cotiledón formaron callos rizogénicos en el medio de cultivo con ANA y los de tallo formaron callos con brotes. Los brotes se enraizaron en medio MS al 50% libre de hormonas y las plantas formadas se aclimatizaron exitosamente en las condiciones de invernadero; no se observaron variaciones morfológicas entre la población durante su desarrollo y las tasas de crecimiento fueron superiores a las reportadas para las plantas silvestres.

En los callos se comprobó por HPLC la presencia de AC en concentraciones similares a las detectadas en las hojas de los árboles en campo, así como su precursor ácido caféico. El otro compuesto fenólico (ISO) no fue producido. Por otra parte, los cultivos de células en suspensión se establecieron a partir de callos friables derivados de explantes de hoja con el tratamiento hormonal de 2,4-D manejando inóculos de 4 y 5 % en peso fresco. Las suspensiones celulares se desarrollaron mejor con el inóculo del 5% y en estos cultivos se determinaron niveles de AC similares a los detectados en las hojas de los árboles silvestres. La ISO se detectó únicamente al final del crecimiento logarítmico. Al disminuir el contenido de los nitratos en el medio MS a 8.0 mM, las biomásas celulares máximas disminuyeron y la concentración de AC detectada se cuadruplicó con respecto a la del cultivo en suspensión

con 27.4 mM de nitratos. Con respecto a la producción de ISO, la síntesis de este compuesto se indujo más temprano y por más tiempo, incrementándose sus niveles al final del cultivo.

Las hojas del árbol silvestre, plantas aclimatada y obtenida por micropropagación con 6 meses en aclimatización, acumularon ambos compuestos en concentraciones similares entre ellas; sin embargo, las plantas derivadas por micropropagación presentaron diferencias significativas en la acumulación del AC a lo largo de su desarrollo. La aglicona de ISO, luteolina, también fue detectada.

Tomando en consideración que las plantas micropropagadas conservaron los componentes y las propiedades hipoglucemiantes de la planta silvestre, se concluye que la propagación *in vitro* representa una alternativa y perspectiva viable para la propagación masiva y uniforme de los árboles de *C. obtusifolia*. Otra contribución importante, es el manejo del cultivo de células en suspensión de *C. obtusifolia* con restricción de nitratos como fuente de material vegetal para la obtención de extractos activos enriquecidos en AC e ISO.

## ABSTRACT

The *Cecropia obtusifolia* tree, popularly known as *guarumbo* in Mexico, is used in folk medicine for treatment of type 2 diabetes mellitus (DM2). *C. obtusifolia*'s antidiabetic effect was assessed in animal models, as well as in humans and attributed to chlorogenic acid (CA) and isoorientine (ISO). The aim of this study was to establish *in vitro* conditions for the micropropagation and development of cell suspension cultures that conserve the capacity to produce the CA and ISO bioactive compounds that exist in the wild plant.

For that, callus cultures of leaf explants from acclimated plant were set up using Murashige and Skoog medium (MS) with different auxins levels; treatments with naphthalene acetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) to 8.92  $\mu\text{M}$  with benzylaminopurine (BAP) to 2.22  $\mu\text{M}$  stimulate highest callus production. Cotyledon, hypocotyl, leaf, and stem explants developed calluses bearing roots in a medium enriched with 2,4-D; when hypocotyl, cotyledon and leaf explants were grown on medium with NAA, they developed morphogenic calluses with the presence of abundant roots, while 75% of stem explants formed simple calluses and the remaining explants developed calluses with shoots. Shoots were rooted on free growth regulator MS medium, and whole regenerated plants were acclimatized under greenhouse conditions; morphological changes were not observed among the population during their development, and growth rates were superior to those reported for wild plants.

Recorded concentrations of CA in the different cell lines were similar to those detected in the leaves of wild plants; its precursor caffeic acid was also detected. The other phenolic compound (ISO) was not produced. On the other hand, cell cultures in suspension were established from friable calluses derived from leaf explants with 2,4-D hormonal treatment and employing 4 and 5 % inocula in fresh weight. Better development of cell suspensions was achieved with the 5% inoculum, and the determined CA levels in these cultures were similar to those detected in leaves of wild plants. ISO was detected only at the end of logarithmic growth. On diminishing nitrate content in the MS medium to 8.0 mM, maximum cell biomasses diminished and the CA concentration detected quadrupled with respect to that of the culture in suspension with 27.4 mM of nitrates. Regarding ISO production, synthesis of this compound was induced earlier and for a longer time period, increasing its levels at the end of culture.

Leaves from wild tree, acclimated and micropropagated plants with 6 month of acclimatization produced both compounds at similar concentrations; however, micropropagation-derived plants presented significant differences in CA accumulation throughout their development. The aglycone of ISO, luteoline, was also detected.

Considering that micropropagated plants retained their ability to produce bioactive compounds and hypoglycemic activity of the wild plant, we concluded that *in vitro* cultures represent an alternative and interesting perspective for *C. obtusifolia* tree multiplication. Another important contribution is the handling of cells suspension culture from *C. obtusifolia* with nitrate restriction like source of vegetal material for the obtaining of enriched active extracts in CA and ISO.

## I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la diabetes mellitus (DM) representa uno de los principales problemas de salud pública que enfrenta hoy en día la sociedad. En el año 2000 se registraron 171 millones de diabéticos mayores de 20 años, actualmente esta cifra se ha incrementado a 246 millones y para el año 2025, se estima que la población afectada será de 380 millones de personas. El incremento de un 42% de los casos se registra en los países desarrollados y del 70% en los países en vías de desarrollo. La incidencia de DM en los países de América Latina es alta (16.2 millones de personas) y se especula que en los próximos 18 años se incrementará al doble, este antecedente permite predecir que México ocupará el 7º lugar en el año 2026 (Wild y col., 2004; World Health Organization, 2005; International Diabetes Federation, 2008).

La DM tipo 2 (DM2) se asocia con una alteración del metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas como resultado del desequilibrio que se establece entre la disponibilidad y el requerimiento de insulina por parte del organismo. Dado los efectos colaterales que presentan los fármacos hipoglucemiantes actualmente en uso, el control de los pacientes diabéticos es una tarea extremadamente difícil; con frecuencia se produce el abandono del tratamiento y aumenta la severidad del padecimiento aunado a la presencia de complicaciones crónicas que pueden llevar a la muerte (Güven y Kuenzi, 1998).

Para encarar esta situación se buscan alternativas terapéuticas y la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha puesto especial atención a las potencialidades que ofrece la herbolaria medicinal, que representa el principal recurso de las medicinas tradicionales de diversos países (World Health Organization, 2005). México cuenta con una gran tradición en el uso de plantas para el control de los pacientes diabéticos; los estudios etnobotánicos registran alrededor de 306 especies (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005); un número importante de estas plantas han sido sometidas a estudios experimentales y en algunas de ellas se ha convalidado el uso popular (Pérez y col., 1984; Román-Ramos y col., 1991; Román-Ramos y col., 1992; Alarcón-Aguilar y col., 2002; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). En este sentido, cabe destacar los efectos biológicos que se han reportado sobre *Cecropia obtusifolia*, que es una de las especies más utilizadas en nuestro país para el control de la DM2 (Román-Ramos y col., 1991; Andrade-Cetto, 2001).

Las propiedades hipoglucemiante e hipolipemiante de *C. obtusifolia* se han demostrado tanto en modelos experimentales en animales y en el humano, estas acciones se atribuyen al ácido clorogénico (AC) y a la isoorientina (ISO) (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2001; Herrera-Arellano y col., 2004; Revilla-Monsalve y col., 2007). La capacidad de la planta para disminuir los niveles séricos de glucosa, colesterol y triglicéridos, la señalan como candidata para el desarrollo de un fitofármaco a utilizar en el tratamiento de DM2.

Las plantas han jugado un papel importante en el desarrollo de los medicamentos de la farmacéutica moderna. Aún en tiempos actuales, se retoma con interés este recurso como una alternativa para el descubrimiento de moléculas prototipos novedosos que sirvan de modelo en la producción de agentes terapéuticos. Un número destacado de metabolitos secundarios con importancia farmacéutica todavía son aislados directamente del vegetal, ya sea éste cultivado o silvestre. Esto sucede porque en muchos casos la síntesis química representa un costo alto no costeable, debido a que se trata de moléculas complejas; o bien, como ocurre con la isoorientina, son fitoalexinas que se producen sólo en condiciones de estrés biótico y/o abiótico (Rout y col., 2000; Stafford, 2002; Marja y col., 2004).

En cambio, la biotecnología ha utilizado los cultivos de células en suspensión como una alternativa atractiva para la producción de estos compuestos que evita la variabilidad de la composición química. Dicha variabilidad es frecuente cuando los compuestos se obtienen de plantas silvestres que crecen expuestas a cambios climáticos de humedad y composición del suelo; además, enfrentan plagas y enfermedades. Otras fuentes de variabilidad que la producción biotecnológica evita es el que se origina por la edad de las plantas y el periodo de colecta de las hojas.

El presente trabajo propuso entre sus objetivos la obtención de los cultivos de callos y de células en suspensión de la especie *C. obtusifolia*, capaces de sintetizar los compuestos con actividad hipoglucemiante que han sido identificados en el árbol silvestre (AC e ISO). Asimismo, se planteó la manipulación del medio en los cultivos de células en suspensión, aplicando técnicas de estrés abiótico específicas para fenoles, para incrementar la producción de los compuestos de interés. Paralelamente, se realizó la propagación masiva de la especie.

El estudio comparativo de los extractos metanólicos derivados de la planta micropropagada y cultivos en suspensión, respecto al de la planta silvestre, se estableció por

medio de la evaluación del efecto hipoglucemiante en ratón normoglucémico, así como por la concentración de los compuestos AC e ISO en los extractos correspondientes.

## II. ANTECEDENTES

### 1. Diabetes mellitus (DM)

La diabetes mellitus (DM) se asocia con una alteración del metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas, resultado del desequilibrio que se establece entre la disponibilidad y el requerimiento de insulina. La diabetes puede desencadenarse como consecuencia de una deficiencia total de insulina o por la liberación de insulina no activa a partir de las células  $\beta$  del páncreas, porque la hormona se destruye antes de que lleve a cabo su acción, o bien, debido a una alteración en la función de los receptores de insulina. El transporte de glucosa en las células del tejido muscular y graso se ve afectado, y la degradación de grasas y proteínas se incrementa (Güven y Kuenzi, 1998).

Una de las funciones que cumple la insulina es inhibir la degradación de las grasas (lipólisis) y, consecuentemente, evitar la liberación de los ácidos grasos libres. Al faltar insulina se liberan ácidos grasos que el hígado transforma en cetonas (cetosis). La DM suele acompañarse de poliuria, polidipsia, glucosuria y cetonemia que pueden desarrollar cuadros agudos y crónicos de cetoacidosis. El coma hiperosmolar, las macro y microangiopatías, neuropatía, retinopatía, infecciones recurrentes e infarto cerebral al miocardio, son las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes con DM (Güven y Kuenzi, 1998).

Entre los principales tipos de DM se encuentra la DM tipo 1, la cual se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas, encargadas de la producción de insulina, provocando una deficiencia absoluta de la hormona. Es dividida en DM tipo IA que es la mediada por autoinmunidad y la DM tipo IB idiopática (causa no conocida). El único tratamiento farmacológico posible es con insulina exógena empleando múltiples dosis o terapia de infusión de insulina subcutánea continua (Mattson, 1998; American Diabetes Association, 2008).

La DM tipo 2 (DM2) representa el 90-95% de los cuadros de diabetes, se caracteriza por niveles de hiperglicemia en ayuno, aún cuando hay insulina disponible. La DM2 resulta de la combinación de la falta de sensibilidad periférica de los tejidos a la acción de la insulina (resistencia a la insulina) y de la secreción pancreática insuficiente e incapaz de compensar estas alteraciones (disfunción de células  $\beta$ ), dando como resultado hiperinsulinemia,

hiperlipidemia, hipercolesterolemia, intolerancia a la glucosa e hipertensión. La DM2, está fuertemente asociada a la obesidad, alrededor del 80% de los individuos diabéticos son obesos, principalmente con obesidad visceral central. No obstante, sólo el 10% de los individuos obesos son diabéticos (Ross y col., 2004). Además, en tejido adiposo, la resistencia a los efectos antilipolíticos de la insulina causa un incremento en la liberación de ácidos grasos. A su vez, estos ácidos grasos atenúan la capacidad de la insulina para inhibir la producción hepática de glucosa, provocando una hiperglucemia. Este desequilibrio del metabolismo de lípidos y carbohidratos acelera la progresión de la resistencia a la insulina. Normalmente las células  $\beta$  del páncreas compensan el estado de resistencia a la insulina incrementando la secreción de la hormona, alcanzando un estado en que las células  $\beta$  pierden esta capacidad y dejan de responder apropiadamente a las concentraciones de glucosa (Ross y col., 2004).

La diabetes es un serio problema de salud con altas tasas de prevalencia y mortalidad. El número de los casos de DM se ha incrementado debido al crecimiento poblacional, a los problemas que trae consigo la urbanización, la edad y sobre todo, por la obesidad y la inactividad física que caracterizan a la sociedad actual. El gasto que implica la atención médica de los pacientes diabéticos, aunado a las pérdidas que derivan de la incapacidad laboral que produce, ubica a la DM entre las enfermedades de mayor costo social y carga financiera para las instituciones de salud (Vázquez-Martínez y col., 2006).

El tratamiento para la DM está basado en cuatro factores fundamentales: educación del paciente concerniente a que tome conciencia sobre la problemática de su enfermedad, ejercicio físico, dieta y medicamentos hipoglucemiantes. Existen cinco categorías de antihiper glucémicos orales, fármacos aprobados por la administración de drogas y alimentos (FDA) (Tuomilehto y col., 2001; Kimmel e Inzucchi, 2005).

a) Biguanidas: la metformina disminuye los niveles de glucosa estimulando la secreción de insulina y disminuye la producción de glucosa hepática. Además, no genera ganancia de peso, incluso en algunos casos hay pérdida de peso; afecta benéficamente el perfil lipídico en plasma, disminuye los marcadores inflamatorios y la función endotelial. A nivel muscular potencia la estimulación del transporte de glucosa en la resistencia a la insulina (Chehade y Mooradian 2000; Ross y col., 2004; Kimmel e Inzucchi, 2005).

b) Tiazolidinedionas (TZDs): incrementan la sensibilidad a la insulina predominantemente en el músculo esquelético y tejido adiposo, mejorando el control glucémico por el incremento en la toma de glucosa por el músculo, disminuyendo la producción de glucosa hepática. La troglitazona se retiró del mercado por ser hepatotóxico, otras TZDs pioglitazona y rosiglitazona son clínicamente efectivas para disminuir los niveles de glucosa en sangre, cuando se toma en ayunas; además, presentan un efecto significativo en disminuir los niveles séricos de triglicéridos (Chehade y Mooradian, 2000).

c) Sulfonilureas: son fármacos (gliburida, glipizida, glimeripida, tolbutamida y glibenclamida) que mejoran los niveles de glucosa en sangre estimulando la secreción de insulina. El principal mecanismo de acción es por la despolarización de las células  $\beta$  pancreáticas y bloqueo de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP, produciendo un flujo de  $Ca^{2+}$  y estimulando la secreción de insulina. Estos fármacos con frecuencia causan efectos adversos como eventos de hipoglucemia prolongados que pueden ocasionar un daño neurológico permanente o incluso la muerte (Chehade y Mooradian, 2000).

d) Metiglinida: la repaglinida es un secretagogo que presenta el mismo mecanismo de acción que las sulfonilureas; el efecto insulínico es regulado por ATP, uniéndose a los canales de  $K^+$  en diferentes sitios de las células  $\beta$  (Chehade y Mooradian, 2000).

Asimismo, el control posprandial de los niveles de glucosa es crítico en el tratamiento temprano de DM y en la reducción de complicaciones cardiovasculares. Una de las terapias aprovechadas en pacientes con DM es la inhibición de las enzimas involucradas en la digestión y absorción ( $\alpha$ -amilasa pancreática y  $\alpha$ -glucosidasas intestinales) de carbohidratos, lo que puede significativamente disminuir el incremento posprandial de los niveles de glucosa en sangre, después de la ingestión de carbohidratos. Es por ello que los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas tales como acarbosa, voglibosa y miglitol son usados solos, o en combinación con insulina y secretagogos de insulina en pacientes con DM2 (Shim y col., 2003; Kwon y col., 2008).

## 2. La herbolaria mexicana en el tratamiento de la DM2

De acuerdo con la OMS, más del 70 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades principales de salud y las plantas medicinales constituyen el principal recurso.

Con base en los reportes existentes sobre las plantas que son utilizadas por la población mexicana para el control de la hiperglicemia, se estima un número entre 269 y 306 especies vegetales que pertenecen a 235 géneros de diversas familias botánicas; entre las que destacan Asteraceae, Leguminosae (Fabaceae), Cactaceae, Euphorbiaceae, Labiatae, Solanaceae, Rubiaceae, Cucurbitaceae, Laminaceae y Rosaceae; siendo las familias Asteraceae y Leguminosae las que comprenden el mayor número de las especies utilizadas. Por otro lado, *Tecoma stans* (Bignoniaceae) es la planta más frecuentemente utilizada para tratar los cuadros hiperglucémicos, seguido de *Aloe barbadensis*, *Cecropia obtusifolia*, *Opuntia streptacantha*, *Psacalium peltatum*, *Bidens pilosa*, *Marrubium vulgare* y *Parmentiera edulis*. Asimismo, se reporta que las hojas son las estructuras vegetales más utilizadas, le siguen los tallos y las raíces (Hernández Galicia y col., 2002; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Los efectos hipoglucemiantes de *Opuntia* spp, *C. obtusifolia*, *M. vulgare*, *Equisetum myriochaetum*, *Enicostemma litorale*, *Trigonella foenum-graecum*, *Ipomea batatas* han sido ya demostrados en estudios clínicos (Fratti-Munari y col., 1992; Revilla y col., 2002; Upadhyay y Goyal, 2004; Herrera-Arellano y col., 2004; Ludvik y col., 2004; Gupta y col., 2005; Revilla-Monsalve y col., 2007). En Alemania, dos productos comerciales elaborados a partir de especies de la herbolaria medicinal mexicana son utilizados para tratar la DM2, uno de estos productos es distribuido por Hando-Austria, es un preparado a base de *Opuntia* sp. (nopal); el segundo es Sucontral de Harras Pharma (Munich) a base de *Hintonia* sp.(copalchi) (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

*C. obtusifolia* es una de las especies que ha recibido gran atención del medio científico. Los resultados obtenidos en la clínica han motivado el desarrollo de diversos proyectos de investigación que abordan aspectos básicos de química, farmacología y toxicología. El diseño y la producción de un fitofármaco requieren del abastecimiento continuo de material vegetal controlado en sus constituyentes bioactivos; este hecho ha propiciado la investigación aplicada de tipo biotecnológico y agronómico.

### **3. *Cecropia obtusifolia* (Bertold)**

#### **3.1. Clasificación taxonómica**

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida

Orden: Urticales

Familia: Moraceae

Género: *Cecropia*

Especie: *Cecropia obtusifolia* (Berthold) (INBio, 2008).

#### **3.2. Sinonimia botánica**

*C. burriada* (Cuatrec), *C. mexicana* (Hemsl), *C. mexicana* variedad *macrostachya* (Donn. Sm), *C. obtusifolia* subespecie *burriada* (Cuatrec) C.C. (Berg y Franco), *C. panamensis* (Hemsl), *C. schiedeana* (Klotzsch) y *C. asperrima* (Pittier) (Argueta, 1994; Gupta, 1995; SEMARNAT, 2008; Conabio, 2008).

#### **3.3. Sinonimia popular**

Dependiendo de la región donde crece la especie *C. obtusifolia* ésta recibe diferentes nombres comunes: i'tó yyá (el hueco o el sordo), palo de hormigas, trompeto, trompeta, trompetillo, tsulte, juaquequistli, tequescuahuitl, quiquiscuahuitl, jarilla y palo de violín (San Luis Potosí); trompeta (Sinaloa); coilotópalo (Distrito Federal); chancarro, shushanguji, hormigo y aqoj (Veracruz); hormigo, hormiguillo, akowa, guarumbo y azcatcuauhit (Puebla); piconi (Hidalgo); trompeto y guarumbo (Guerrero); guarumbo y guarina (Tabasco); guarumo, guarumbo, guarina, c'oloc' (Chiapas); k'axxixkooch, k'ooch y koochle' (Quintana Roo-maya); k'aaxi, k'aaxil, k'o'ochle', k'o'chte, xk'o'och, koochle' y xk'ochle (Yucatán); sarumo y trompeto (Michoacán); shushanguji (Veracruz); huitapil y guarumbo (Jalisco) y yaba, yabioo, yava,

yaga-gacho, chancarro, guarumbo y joot (Oaxaca) (Martínez, 1969; Argueta y col., 1994; Aguilar y col., 1994; Aguilar y col., 1998; Conabio, 2008; SEMARNAT, 2008).

### **3.4. Localización geográfica de la especie**

La especie *C. obtusifolia* es originaria de América Central, actualmente se localiza desde México hasta el norte de Sudamérica. Habita en climas tropicales, cálidos, semicálidos y templados, desde el nivel del mar hasta los 1500 m. Crece en la vegetación secundaria, en la vegetación perturbada derivada de bosque y en las selvas tropicales caducifolios, subcaducifolios, subperennifolios o perennifolios, algunas veces asociada a matorral xerófito de cactáceas o cedros, en pastizal y bosque mixto de encino-pino (Martínez, 1969; Argueta y col., 1994; Aguilar y col., 1994, 1998; Conabio, 2008; SEMARNAT, 2008).

En México esta planta tiene un área de distribución muy extensa. En la vertiente del Golfo se localiza comenzando en Tamaulipas hasta Quintana Roo, y en la zona del pacífico, desde Sinaloa hasta Chiapas. También se encuentra en los estados de Puebla, Hidalgo y Guanajuato (Martínez, 1969; Argueta y col., 1994; Aguilar y col., 1994, 1998; Conabio, 2008; SEMARNAT, 2008).

### **3.5. Descripción botánica**

*C. obtusifolia* es un árbol (15 hasta 35 m de altura) con pocas ramas y en algunas ocasiones presentan raíces adventicias en la base del tronco (Figura 1). El tronco es monopódico, cilíndrico, recto y hueco en el centro, normalmente está habitado por hormigas. La corteza externa es lisa, gris clara, con estípulas y lenticelas negras dispuestas en líneas longitudinales. La corteza interna es de color crema verdoso, fibrosa y contiene un exudado (Martínez, 1969; Aguilar y col., 1994; Gupta, 1995; Aguilar y col., 1998; Conabio, 2008; SEMARNAT, 2008).

La copa presenta la forma de una sombrilla estratificada con todas las hojas expuestas a la luz directa del sol (Figura 1). Las hojas se distribuyen en espiral aglomeradas hacia las puntas de las ramas, son lanceoladas durante las primeras etapas del desarrollo de

las plántulas y posteriormente son simples, peltadas y profundamente palmadas divididas con 8 a 15 lóbulos profundos (Figura 2); además, están cubiertas de pubescencia y presentan una inervación rojiza prominente. Al secarse la hoja se torna rígidamente cartácea a subcoriácea, verde oscuro y escábrido en el haz, verde pálido o con más frecuencia blanco-grisácea en el envés, con nervaduras cubiertas por puberulencia dispersa (Aguilar y col., 1994; Gupta, 1995; Aguilar y col., 1998; Conabio, 2008; SEMARNAT, 2008).



Figura 1. Árbol de *C. obtusifolia* “guarumbo” en su hábitat natural.

Los pecíolos (25 a 90 cm de largo y de 10 a 15 mm de grueso) están longitudinalmente canaliculados y provistos de puberulencia diminuta (de 0.1 a 0.3 mm) de color gris-blanquecino (SEMARNAT, 2008). La lobulación de las hojas coincide con la aparición de unas estructuras membranosas llamadas triquillos (Figura 2) en la parte basal de cada pecíolo, en éstas, se producen unos órganos multicelulares en forma de huevo (0.75 por 0.25 mm) de color blanco llamados cuerpos Mülllerianos que las hormigas remueven con fines alimenticios (Conabio, 2008; SEMARNAT, 2008).



Figura 2. Características de las hojas, pecíolos e inflorescencias de *C. obtusifolia*.

El árbol de *C. obtusifolia* es una especie dioica. Las inflorescencias masculinas se presentan en espigas (12 a 18) de 8 a 22 cm de largo y de 2 a 5 mm de diámetro que emergen en pedúnculos individuales de una espata (Figura 2); en tanto que las espigas (4) de las inflorescencias femeninas son de 18 a 50 cm de largo y de 3 a 6 mm de ancho (Figura 3) y el pedúnculo común es de 6 a 32 cm de largo y de 6 a 8 mm de grueso, esparcidamente pubérulo con pelos delgados y blanquecinos de 0.5 mm de largo (Martínez, 1969; Aguilar, 1998; Conabio, 2008; SEMARNAT, 2008).

Las espigas fructíferas son de color verde amarillento a pardo oscuro y miden 10 mm de grosor. El fruto (2 mm de largo y 1.2 mm de ancho) es redondeado en el ápice y en la base con la superficie lisa (Figura 3) y contiene 2,700 a 4,700 aquenios de color marrón brillante, muy pequeños con una semilla (1 a 2.8 mm de largo y 0.8 a 1.3 mm de ancho) de color pardo brillante cada uno. Aparentemente se encuentra en flor y fruto a lo largo del año (Argueta y col., 1994; Gupta, 1995; Aguilar y col., 1998; Conabio, 2008; SEMARNAT, 2008).



Figura 3. Características de los frutos y semillas de *C. obtusifolia*.

### 3.6. Aspectos fisiológicos de la planta

El género se caracteriza por un rápido crecimiento en altura mayor a los 3 m y 2 cm de incremento diametral por año. Las plántulas (0.5 a 15 cm de altura) crecen a una tasa de 1.5 cm mensuales en promedio. Son árboles de corta vida, normalmente no viven más de 30 años (Conabio, 2008). La viabilidad inicial de las semillas es del 90% y la van perdiendo al pasar el tiempo, la latencia del tipo fotoblástica es impuesta. En un estudio se observó que de todas las semillas producidas en 5 hectáreas en un año, solamente el 40% de ellas llegan al suelo y la mitad son viables; después de un año, sólo el 2.87% permanecen viables y 4.4% germinan en los claros. Para germinar las semillas se requiere de humedad y temperatura favorable (16 a 36 °C) que puede ser constante o fluctuante y requieren varias exposiciones consecutivas y prolongadas de luz infrarrojo para alcanzar la máxima germinación. La primera reproducción ocurre alrededor de los 3 años después de la germinación (Conabio, 2008).

### **3.7. Usos medicinales**

Del centro hasta el sureste de México, el uso medicinal más frecuente de *C. obtusifolia* es como remedio antidiabético, para lo cual se emplea la infusión de las hojas, ramas, corteza o raíz como agua de uso. Cuando se utilizan las hojas de la planta, se recomienda hervir 3 ó 4 hojas tiernas en 2 L de agua (Martínez, 1969; Argueta y col., 1994; Aguilar y col., 1994; Gupta, 1995; Aguilar y col., 1998; Conabio, 2008; SEMARNAT, 2008).

### **3.8. Actividad hipoglucemiante de extractos de hojas**

#### **3.8.1. Estudios en animales de experimentación**

La actividad hipoglucemiante de *C. obtusifolia* ha sido evaluada utilizando diferentes modelos biológicos. La infusión de hojas secas (1g/10mL), administrada por vía intravenosa en una dosis de 150  $\mu$ L/Kg en perros mongrel con pancreatectomía parcial y total produjo una disminución de los niveles de glucosa en sangre desde la segunda hora después de su administración; la hipoglucemia no se acompañó por el incremento en los niveles plasmáticos de insulina, pero se produjo una elevación significativa en las cifras plasmáticas de triglicéridos. Los resultados permitieron asumir que el efecto hipoglucemiante no está asociado con una estimulación sobre las células  $\beta$ -pancreáticas (Mellado y Lozoya-Meckes, 1984).

En otros estudios, se reporta el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de las hojas de *C. obtusifolia* en ratones con hiperglucemia inducida con aloxana (Pérez y col., 1984) y en conejos con hiperglucemia inducida por cargas dobles de glucosa (Román y col., 1991). En ratas tratadas con estreptozotocina, el trabajo de Andrade-Cetto y Wiedenfeld (2001) reportó también el efecto antihiperglucemiante producido por los extractos acuoso y butanólico, así como por el ácido clorogénico (AC) y la isoorientina (ISO) aislados de la planta (Figura 4). Recientemente, se ha concluido que el extracto butanólico de las hojas de esta especie disminuye la hiperglucemia posprandial en las ratas estreptozotomizadas; este efecto fue asociado con la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas del intestino, impidiendo con ello el desdoblamiento de carbohidratos complejos y retardando la absorción de la glucosa (Andrade-Cetto y col., 2008). Observaciones realizadas en ratones normoglucémicos

reproducen el efecto hipoglucemiante del extracto metanólico administrado vía oral en dosis de 1g/Kg (Nicasio y col., 2005).

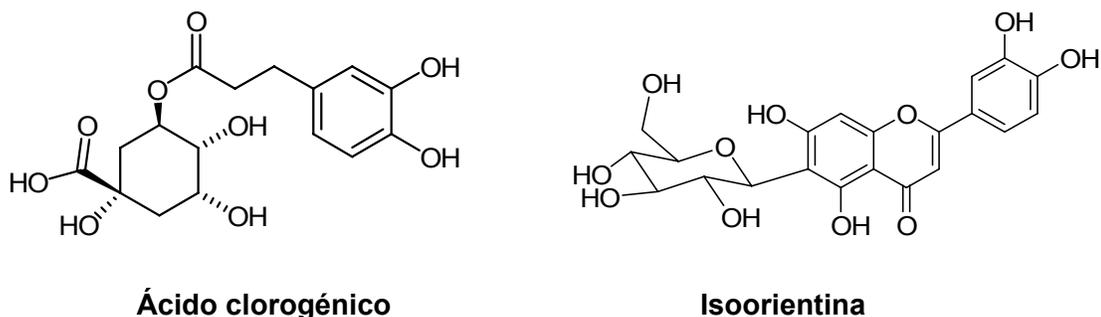


Figura 4. Compuestos con actividad hipoglucemiante aislados de las hojas de *C. obtusifolia*.

Con respecto al AC, se han dirigido estudios metabólicos para establecer la correlación entre el consumo de café y la diabetes, demostrando que los polifenoles existentes y principalmente el AC que se encuentra en concentraciones elevadas en esta bebida, tienen gran capacidad antioxidante. Asimismo, se ha postulado que el AC actúa protegiendo a las células beta del páncreas y además, disminuye la absorción intestinal de la glucosa aumentando los niveles del péptido tipo glucagon-1 (GLP-1) y disminuyendo los del polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP), fenómenos que se traducen en disminución de la glucosa plasmática (Johnston y col., 2003; McCarty, 2005).

Se han llevado a cabo estudios en ratas Zucker (*fa/fa*) obesas, hiperlipidémicas y resistentes a insulina para evaluar el efecto del AC administrado por vía intravenosa, y se demostró que el AC disminuye el pico postprandial de la glucosa sin producir una hipoglucemia sostenida. También, disminuyó significativamente los niveles séricos de colesterol y de triglicéridos, así como los de triglicéridos hepáticos (Rodríguez de Sotillo y Hadley, 2002).

Asimismo, se ha corroborado el efecto hipoglucemiante e hipolipemiante por la administración vía oral de ISO, durante 2 semanas, a ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. Los resultados confirman que este compuesto disminuye los niveles de

glucosa, de colesterol y de triglicéridos a partir del 5º día de tratamiento. El efecto se sostuvo hasta 10 días después de suspender la administración del compuesto (Sezik y col., 2005).

Además, AC e ISO, son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I al vasoconstrictor más potente angiotensina II (ECA), lo que le confiere también propiedades antihipertensivas a *C. obtusifolia* (Lacaille-Dubois y col., 2001).

### **3.8.2. Estudios clínicos**

En un diseño al azar y doble ciego con diabéticos de ambos sexos de entre 30 y 60 años de edad ( $\geq 140$  mg/dl de glucosa sanguínea), los pacientes tomaron antes de cada alimento la infusión preparada con 1 g del vegetal en 125 mL agua caliente durante 21 días consecutivos, como coadyuvante en el tratamiento prescrito con glibenclamida; el contenido de AC en cada dosis fue de  $2.99 \pm 0.14$  mg/g de hojas secas. Los resultados mostraron disminución de los niveles de glucosa, colesterol (14.62%) y triglicéridos (42%) en sangre, con una eficiencia terapéutica de  $\geq 25\%$  determinándose una reducción de la glucemia del 15.25% respecto al grupo control tratado sólo con el hipoglucemiante oral. Los niveles de creatinina y urea en suero no presentaron alteraciones patológicas al final de la observación (Herrera y col., 2004).

En un siguiente estudio, un grupo de pacientes recientemente diagnosticados como diabéticos y sin tratamiento con hipoglucemiantes orales, recibieron diariamente como agua de uso una infusión preparada con 13.5 g/L de hojas de *C. obtusifolia* (AC=2.91 mg; ISO=2.4 mg). Al término de 32 semanas los autores concluyeron que el extracto tiene un efecto hipoglucemiante significativo y sostenido. Por el contrario, el colesterol, triglicérido e insulina no se modificaron. A partir de las 6 semanas, la hemoglobina glicosilada también se redujo de manera significativa y sostenida. Al suspender el tratamiento, se observó que el proceso se revierte. Las enzimas hepáticas determinadas indican que el producto no es tóxico (Revilla-Monsalve y col., 2007).

### **3.9. Toxicidad de extractos de hojas**

La dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del extracto acuoso de hojas de *C. obtusifolia* administrado vía intraperitoneal en la rata fue de 1.45±0.07 g/Kg (equivalente a 11.21±0.52 g/Kg peso corporal de la hoja seca). En los animales tratados se observó un estado de relajación general, somnolencia y piloerección (Pérez-Guerrero y col., 2001). En los ratones, la DL<sub>50</sub> reportada para el extracto metanólico de las hojas fue >5 g/Kg. En el estudio subagudo por 30 días, la dosis diaria de 3 g/Kg del extracto metanólico no mostró alteraciones en las pruebas conductuales ni en los cortes histológicos de diferentes órganos (Aguilar, 2004).

## **4. La biotecnología como herramienta para la producción del material vegetal**

En la literatura científica hay antecedentes respecto a la propagación vegetativa de *C. obtusifolia* por medio de esquejes y de acodos aéreos. Con los esquejes se reporta la formación de raíces utilizando una mezcla de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB); en cambio, con los acodos aéreos, se logró un enraizamiento superior y sin necesidad de aplicar hormonas (LaPierre, 2001).

El material vegetal que se ha utilizado hasta ahora para valorar las propiedades químicas y farmacológicas de *C. obtusifolia* proviene de plantas silvestres. El conocimiento generado por la investigación de la especie y su potencial como agente hipoglucemiante no tóxico y su propuesta para el desarrollo de un fitomedicamento, obligan a considerar otras alternativas. Actualmente, las hojas de *C. obtusifolia* son empleadas por algunas industrias mexicanas para la elaboración de productos herbolarios (Químicos y Vegetales Rowi, S.A. de C.V., Zapopan, Jalisco; Ciencia y Salud: Fórmulas Herbolarias, México, D.F) y también son exportadas a Europa con el mismo propósito (Gutiérrez Domínguez y Betancourt Aguilar, 2008). Se puede proponer la micropropagación de este vegetal con cultivo de tejidos vegetales, o bien, la implementación de técnicas para el desarrollo de cultivos productores de los metabolitos secundarios de interés biológico, tema central del presente proyecto.

## 5. Metabolismo secundario

El metabolismo es el proceso de utilización y transferencia de masa y energía que permite la vida de los organismos. Participan en este proceso: a) los metabolitos primarios que son los compuestos esenciales y universales en todas las especies (sacáridos, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos y bases nitrogenadas, los que a su vez, dan lugar a moléculas más grandes poliméricas: proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos); y b) los metabolitos secundarios, que son particulares de cada especie y que independientemente de que no son esenciales, cumplen un papel importante en la interacción de la planta con su medio ambiente (Bourgau y col., 2001; Nugroho y Verporte, 2002).

Los metabolitos secundarios tienen una estructura única y compleja, y su producción está frecuentemente asociada a condiciones de estrés biótico y abiótico. En general, se acepta que los metabolitos secundarios son necesarios para la sobrevivencia de la planta en su ecosistema; ya que algunos (fitoalexinas) poseen propiedades antimicrobianas y por lo tanto protegen a la planta de los agentes patógenos. Asimismo, ejercen acciones antigerminativas o tóxicas para otras plantas (alelopatía); actúan sobre los insectos (propiedades antialimentarias o insecticidas); son útiles para repeler predadores y atraer polinizadores o simbiosis; finalmente, absorben el exceso de energía luminosa evitando el daño producido por la fotooxidación (Bourgau y col., 2001; Nugroho y Verporte, 2002; Marja y col., 2004).

La síntesis de los metabolitos secundarios se deriva del metabolismo primario a través de una ruta compleja en la que intervienen diversas enzimas, es característica para cada especie o género, y se activa en estadios particulares del crecimiento y desarrollo de la planta. Se han establecido rutas generales para la biosíntesis de los metabolitos secundarios y las reacciones enzimáticas pueden activarse o inhibirse genéticamente de acuerdo con las condiciones existentes: disponibilidad de los nutrientes, lesiones, ataques microbianos, sequía, depredación, agentes químicos (herbicidas), cambios de temperatura, humedad, etc. (Brunneton, 1999; Nugroho y Verporte, 2002).

De manera general se distinguen tres rutas bioquímicas, a saber: ruta del *ácido shiquímico* que genera dos familias de compuestos secundarios, los alcaloides y los compuestos fenólicos, ruta del *ácido mevalónico* que da origen a compuestos secundarios

terpénicos y la ruta *de los policétidos* (acetogeninas) que produce compuestos fenólicos (Brunneton, 1999; Nugroho y Verporte, 2002).

La biosíntesis de los metabolitos secundarios AC e ISO en *C. obtusifolia* no ha sido aún descrita, pero ambos constituyentes pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos.

## **5.1. Biosíntesis de compuestos fenólicos**

La ruta del shiquimato es la mayor fuente de formación de compuestos aromáticos y se inicia a partir de la condensación del carbohidrato eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato (Figura 5). Por medio de una serie de reacciones se forma el compuesto corismato, a partir del cual la ruta se diversifica en dos ramas principales: la primera está dirigida a la síntesis de fenilalanina o tirosina y la consecuente formación de fenoles; la segunda vía del triptofano para la síntesis de alcaloides (Nugroho y Verporte, 2002; Lyon, 2008).

Algunas plantas podrían presentar rutas del ácido shiquímico duales para la formación de aminoácidos aromáticos: la plastídica que dirige a la formación de metabolitos primarios y la citosólica para la formación de metabolitos secundarios (Nugroho y Verporte, 2002).

### **5.1.1. Biosíntesis del ácido clorogénico (AC)**

Los ácidos fenólicos son compuestos que poseen en su estructura química un anillo aromático, grupos hidroxilos y una función carboxílica. La clave para la formación de estos productos es la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) que, por desaminación no oxidativa, convierte a la fenilalanina en ácido *trans*-cinámico (Figura 6). La PAL es fundamental para la vida de las plantas ya que regula el metabolismo secundario y su activación depende de diversos factores externos e internos tales como: nivel de nutrientes, luz, hormonas, infección producida hongos, heridas, etc. (Nugroho y Verporte, 2002; Lyon, 2008).

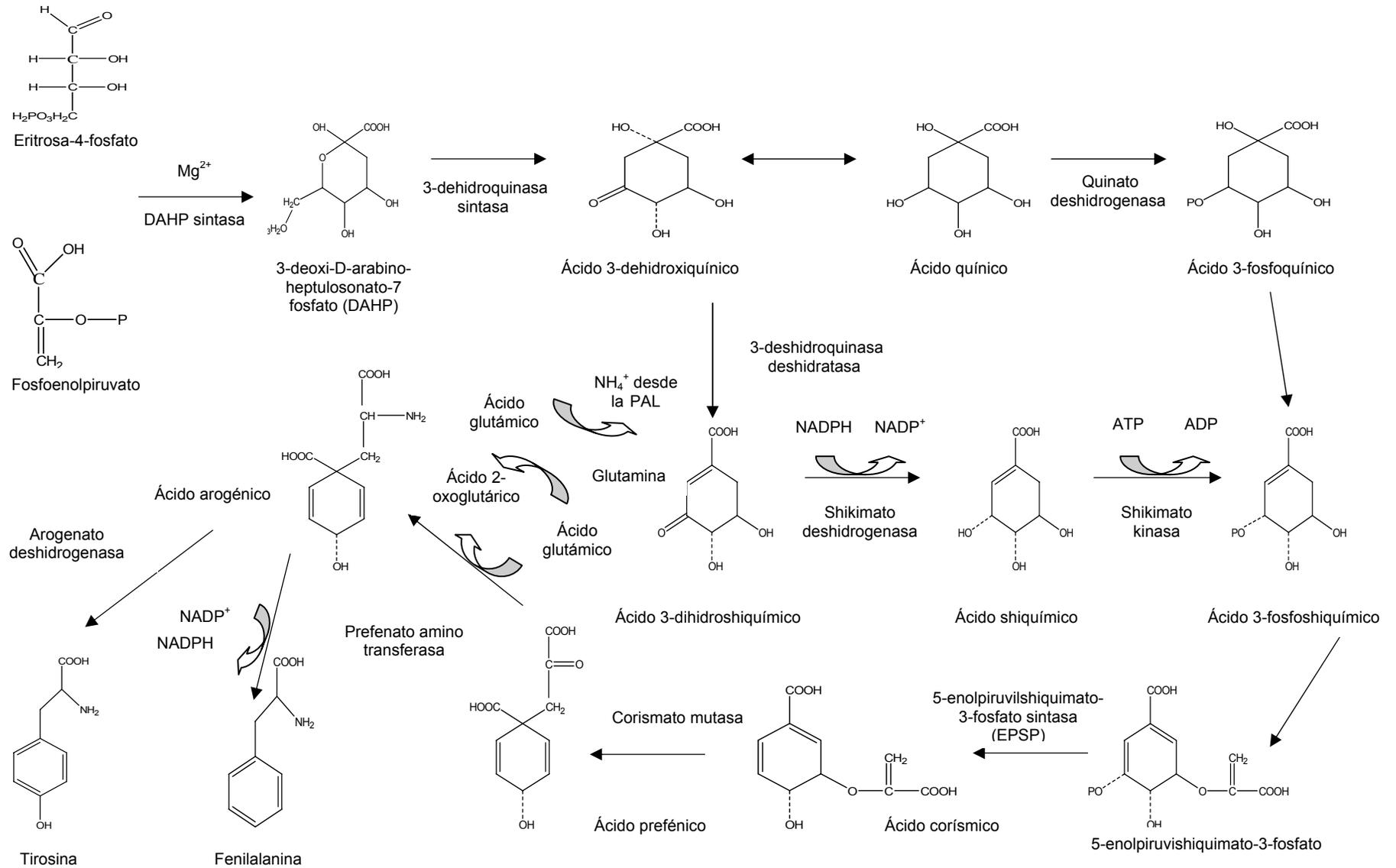


Figura 5. Ruta del ácido shiquímico

El ácido *trans*-cinámico es hidroxilado por la enzima cinamato 4 hidroxilasa (C4H) para formar el ácido *p*-cumárico; este puede generarse también a partir de la tirosina por acción de la enzima tirosina amonioliasa perdiendo el grupo  $\text{NH}_4^+$  (Figura 6). El ácido *p*-cumárico se transforma en ácido clorogénico a través de dos vías: 1) Por acción de la cumarato 3 hidroxilasa (C3H) se forma el ácido caféico, el cual es esterificado con el ácido quínico por medio de la hidroxicinamoil-CoA quinato transferasa (HQT) originando uno de los isómeros del AC. 2) Siguiendo la otra vía, se forma el compuesto *p*-cumaril CoA por acción de la hidroxicinamato CoA ligasa (4CL), el cual es transformado por la cinamato-hidroxicinamoiltransferasa en ácido quínico *p*-cumaril CoA, compuesto que genera AC (Figura 6) (Nugroho y Verporte, 2002; Lyon, 2008).

### **5.1.2. Biosíntesis de isoorientina (ISO)**

Compuestos del tipo fenilpropanoides pueden ser activados por ligasas para producir ésteres de CoA (éster cumaril CoA, ferúlico CoA, caféico CoA) que dan origen a compuestos de mayor complejidad como los flavonoides (Nugroho y Verporte, 2002; Lyon, 2008).

La ruta más importante es la cumaril-CoA que acopla una unidad de 2C para formar malonil-CoA. Esta reacción es catalizada por la chalcona sintasa (CHS) para formar naringina (Figura 6). El cierre del anillo de esta chalcona da origen a la naringenina, molécula base de los flavonoides; a partir de este compuesto se origina luteolina cuya conjugación con una molécula de glucosa dará origen a la ISO (Nugroho y Verporte, 2002; Lyon, 2008).

## **6. Metabolitos secundarios en los cultivos de tejidos vegetales**

Hoy en día, el 50% de los medicamentos que se prescriben son compuestos que sintetizan los vegetales. En el 25% de estas prescripciones, los constituyentes se obtienen directamente de las plantas, se trata de compuestos semisintéticos o bien, sustancias que han tomado como molde la estructura molecular de origen natural (Stafford, 2002; Marja y col., 2004).

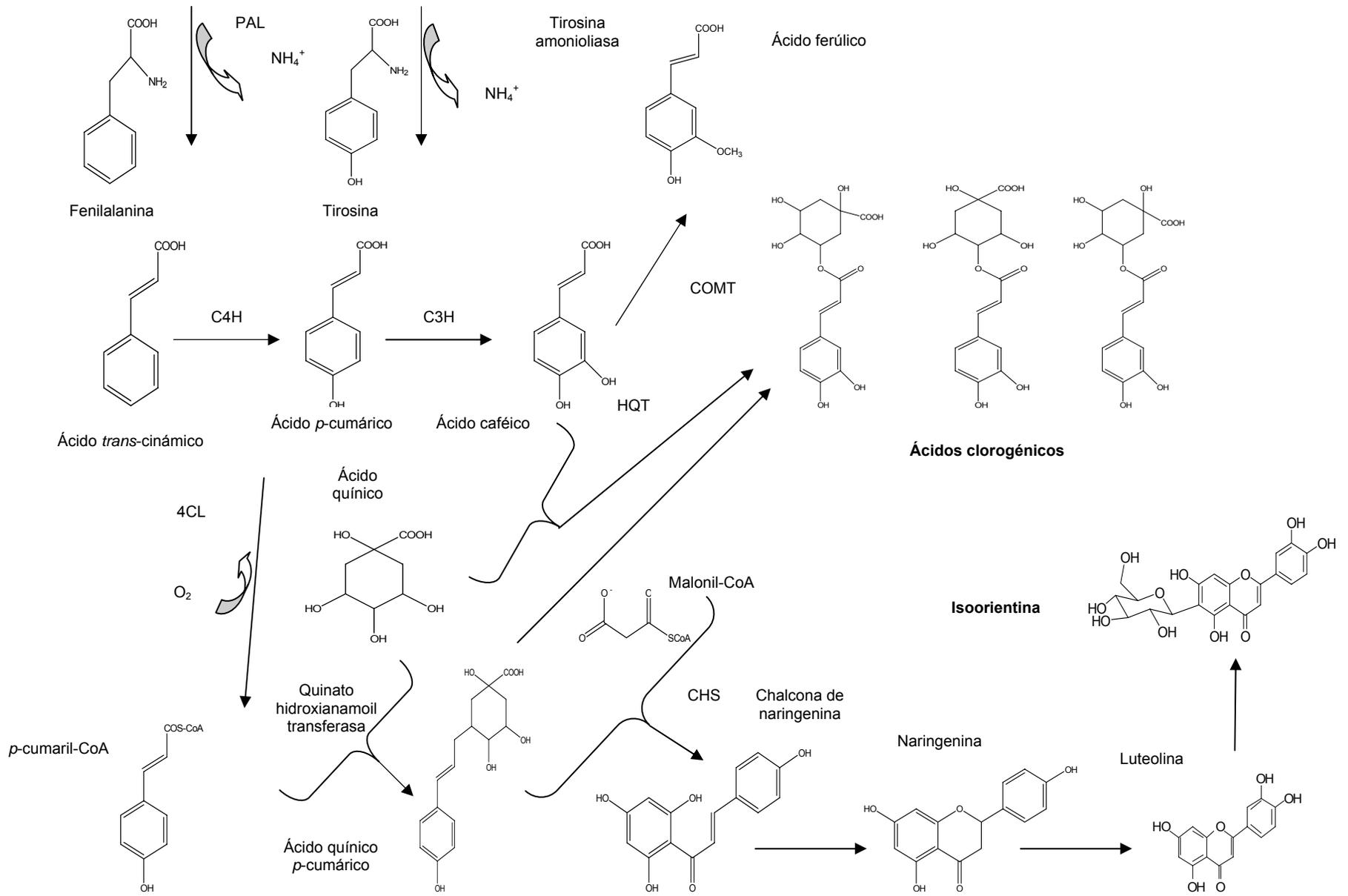


Figura 6. Biosíntesis de fenoles.

Muchos de los metabolitos activos no son fáciles de sintetizar en el laboratorio y la planta constituye la única fuente, o al menos, la más económica para obtenerlos. Por ejemplo, la extracción directa del vegetal resulta un proceso menos costoso como ocurre con la morfina, la L-dopa o la quinina, por mencionar algunos. En el caso del taxol, se logró sintetizar en 1994, pero no es un proceso rentable debido a su rendimiento extremadamente bajo.

El taxol es un agente antimitótico utilizado para tratar la leucemia, cáncer de próstata y de mama. Es un alcaloide diterpénico que se extrae de la corteza de algunas especies del género *Taxus*, particularmente *Taxus brevifolia*. El crecimiento de estas especies es muy lento, por lo que se ha utilizado un precursor del taxol, la 10-deacetilbaccatina III, que se encuentra en concentraciones superiores en las acículas de *Taxus baccata*. El taxotere es un análogo del taxol que presenta una mejor solubilidad y disponibilidad biológica y fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de cáncer de mama metastásico, o en casos de resistencia a otros fármacos. También se ha prestado atención a los cultivos de callos y suspensiones de células vegetales como una alternativa para producir taxol (Stafford, 2002; Marja y col., 2004).

Otros cultivos de células en suspensión que han resultado exitosos son: la shikonina y el alcaloide berberina los cuales se obtienen de *Lithospermum erythrorhizon* y de *Coptis japonica*, respectivamente. Destaca también la producción del ácido rosmarínico, en gran escala, a partir del cultivo de células de *Coleus blumeii*; o bien, de la sanguinarina en *Papaver somniferum*, que tiene un importante potencial de mercado como producto para la higiene bucal. Los compuestos anticancerígenos topotecan (GlaxoSmithKline) e irinotecan (Pharmacia Corp/Aventis SA/Daiichi Seiyaku Co Ltd) son derivados semisintéticos de camptotecina, un alcaloide que ha sido aislado de diversas especies vegetales. La camptotecina se acumula en los cultivos de células en suspensión de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) y de *Nothapodytes foetida* (Icacinaceae) con niveles máximos de 1 mg/L (intracelular) y 35 mg/L (extracelular). El rendimiento de los alcaloides en ambas especies se puede modificar al variar la composición de las fitohormonas en el medio de cultivo (Stafford, 2002).

Finalmente, la podofilotoxina (PDT) se utiliza para la preparación semisintética de los agentes antineoplásicos etopósido y tenipósido. El rendimiento de PDT es similar entre los cultivos de células en suspensión de varias especies de los géneros *Callitris* (Cupressaceae), *Linum* (Linaceae) y *Podophyllum* (Berberidaceae) (Stafford, 2002).

De lo anterior se desprende que la producción biotecnológica utilizando cultivos de células u órganos constituye en la actualidad una alternativa viable muy atractiva (Tabla 1). A través de esta novedosa tecnología se han descubierto hasta la fecha 92 nuevas estructuras con actividad biológica (Rout y col., 2000; Stafford, 2002; Marja y col., 2004). Además, se han desarrollado diversas estrategias para incrementar la producción de los metabolitos secundarios de interés, y los cultivos de células en suspensión facilitan el proceso.

La acumulación de metabolitos secundarios en las plantas superiores generalmente se da en los tejidos o células que se encuentran en un estadio específico; es decir, es un proceso que está estrechamente relacionado con el crecimiento celular y la diferenciación celular. En los cultivos celulares, la máxima acumulación de estos compuestos se obtiene durante la fase estacionaria, aunque algunos de ellos, tales como las betalainas y los carotenoides están asociados al crecimiento (Bourgaud y col., 2001; Mithöfer y col., 2004).

La estimulación es el procedimiento más utilizado para promover la producción de los metabolitos secundarios en los cultivos de tejidos vegetales; y consiste en la aplicación de estimuladores (Stafford, 2002; Mithöfer y col., 2004) que pueden ser bióticos (paredes celulares, esporas, celulasa, metil jasmonato, glicoproteínas, etc.) o abióticos (luz UV, iones de metales pesados, cambios del pH, detergentes, glutatión, salinidad, temperatura, etc.) (Charlwood y Rhodes, 1990; Dornenburg y Knorr, 1995; Bourgaud y col., 2001) (Tabla 1). Los diferentes tipos de estímulos pueden sobreexpresar los genes y activar las rutas biosintéticas que dirigen hacia una mayor producción de los metabolitos de interés (Stafford, 2002).

### **6.1. Reducción del contenido de nitratos en los cultivos de células en suspensión**

Cuando se modifica el suplemento de carbono o de nitrógeno en el medio nutritivo de una planta o del cultivo *in vitro*, cambia la relación carbono:nitrógeno, alterándose de manera importante los niveles de los metabolitos primarios y consecuentemente el de los secundarios. Esta hipótesis sobre el balance de nutrientes de carbono y de nitrógeno en las plantas postula que cuando hay una limitación en el nitrógeno, el metabolismo secundario está dirigido a la síntesis de metabolitos ricos en carbono; por el contrario,

cuando se limita el carbono, éste se dirige hacia la producción de metabolitos enriquecidos en nitrógeno (Fritz y col., 2006).

Por ejemplo, las plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* deficientes de la enzima nitrato-reductasa, se comportaron como las plantas silvestres en condiciones de un alto contenido de nitratos; es decir, tienen niveles bajos de los ácidos benzoico, cumárico, caféico, clorogénico y el glicoflavonol rutina. Por el contrario, la planta silvestre con deficiencia de nitratos en la solución fertilizante mostró altos niveles de fenilpropanoides y el flavonoide. Estos resultados indican que la estimulación del metabolismo de los fenilpropanoides en plantas de tabaco deficientes de nitrógeno, responde a la disminución de los nitratos (Fritz y col., 2006).

Al disminuir la concentración de los nitratos en el fertilizante que se adiciona a las plantas de *N. tabacum*, se favorece la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de los fenilpropanoides (Figura 6): fenilalanina-amonoliase (*PAL1*) [fenilalanina → ácido *trans*-cinámico]; la cinamato 4 hidroxilasa (*C4H*) [ácido *trans*-cinámico → ácido *p*-cumárico]; la hidroxicinamato CoA ligasa (*4CL*) [ácido *p*-cumárico → *p*-cumaril CoA]; la hidroxicinamoil CoA quinototransferasa (*HQT*) [ácido caféico → ácido clorogénico] (Fritz y col., 2006). Estos antecedentes se tomaron en consideración en el presente estudio para diseñar el protocolo encaminado a estimular la biosíntesis de AC e ISO en los cultivos de células en suspensión de *C. obtusifolia*.

## **6.2. La micropropagación de plantas medicinales**

Como se mencionó, la industria farmacéutica aún depende en gran medida de las plantas silvestres como materia prima para la extracción de importantes agentes terapéuticos, situación que ha provocado una mayor demanda de plantas medicinales. Esta sobreexplotación, aunada a las modificaciones severas del suelo como producto de las actividades agrícolas, el proceso de urbanización y la deforestación entre otros factores, ha puesto en peligro la diversidad genética de las plantas medicinales del país (Rout y col., 2000; Nalawade y Tsay, 2004; Marja y col., 2004). La micropropagación de las plantas medicinales, es una alternativa viable para contrarrestar dicha problemática.

Tabla 1. Metabolitos secundarios y compuestos *de novo* producidos en cultivos de células en suspensión de plantas.

Especie	Compuesto		Estimulador	Producción	Actividad biológica
	en planta	<i>de novo</i>			
<i>Taxus yunnanensis</i>	40 taxoides	6 taxoides			Anticancerígena
<i>T. chinensi</i>		6 taxoides			
<i>T. cuspidata</i>		6 taxoides			
<i>T. canadensis</i>		1 taxoide	Metiljasmonato Hongos endófitos Cambios de temperatura		
	Paclitaxel		Metiljasmonato	100 mg/L	
<i>Rauvolfia serpentina</i>	Alcaloides indólicos	3-oxorhazinilam			Anticancerígena
<i>Ajuga reptans</i>		Derivados de fenantrofurano			Antiangiogénica
<i>A. forrestii</i>	Derivados de fenantrofurano (ajuforrestina)				
<i>Boerhavia difusa</i> (Nyctaginaceae)	Compuestos fenólicos (boeravinonas A y B)	3 compuestos fenólicos			Antifúngica
<i>Mirabilis jalapa</i> (Nyctaginaceae)	Compuestos fenólicos (boeravinonas A y B)				
<i>Camptotheca acuminata</i> (Nyssaceae)	Camptothecina		Fitohormonas	1 mg/L (intracelular)	Anticancerígena
<i>Nothapodytes foetida</i> (Icacinaeae)				35 mg/L (extracelular)	
<i>Linux álbum</i>	Podofilotoxina			28 mg/L	Antineoplásica
<i>Chamomilla recutita</i>	Umbeliferona		CuCl <sub>2</sub>		
<i>Datura stramonium</i>	Lubimina, 3-OH-lubimina		CuCl <sub>2</sub> ; CdCl <sub>2</sub>		

La estandarización de los principios activos en las plantas medicinales es un factor importante a considerar dado que la composición química del vegetal depende de un sinnúmero de variables, entre ellas la época de colecta, la localidad, la interacción con otros vegetales, infestaciones por microbios e insectos, etc. (Rout y col., 2000; Nalawade y Tsay, 2004).

La propagación a través de meristemas produce plantas que son genéticamente idénticas a la planta donadora. Por ello, la micropropagación de diversas plantas medicinales se ha llevado a cabo a través de la rápida proliferación de yemas apicales y axilares en cultivo; tal es el caso de *Atropa belladonna*, *Digitalis lanata*, *Valeriana wallichii*, *Rauwolfia serpentina*, *Psoralea corylifolia*, *Pichohiza kurroa* y *Ocimum basilicum* por mencionar algunas. La aplicación de estas técnicas no sólo ha permitido conservar ciertas poblaciones de plantas medicinales reduciendo el riesgo de su extinción, también dan la posibilidad de mantener la uniformidad clonal que no se logra a través de las semillas (Rout y col., 2000; Nalawade y Tsay, 2004).

*C. obtusifolia* es de gran importancia en la medicina tradicional mexicana para el control de la diabetes y crece de manera silvestre en el país; la disminución de sus poblaciones lleva a la propuesta de implementar el procedimiento *in vitro* para propagar la especie que servirá de material biológico para su estudio, desarrollo de un fitomedicamento y aplicación de éste en la clínica.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, la industria farmacéutica y la comunidad científica consideran a las plantas medicinales como una de las fuentes naturales a explorar que cubran las expectativas del sector salud.

México cuenta con una gran diversidad de plantas medicinales que se han utilizado desde épocas ancestrales para tratar las enfermedades. Este proceso ha propiciado a su vez, el desarrollo de un conocimiento valioso sobre las propiedades curativas de estos vegetales. El interés que existe actualmente en torno a las potencialidades que ofrecen las plantas medicinales, ha suscitado la búsqueda de opciones para proteger y preservar a aquellas especies en riesgo de sobreexplotación. En México, la demanda de especies medicinales se ha incrementado notablemente; no obstante, el cultivo *in vitro* de estas especies es extremadamente escaso. Estas circunstancias han motivado el desarrollo de procedimientos biotecnológicos para la multiplicación clonal de los vegetales o el desarrollo de cultivos celulares como fuente productora de metabolitos secundarios.

La diabetes mellitus es un problema de salud mundial que tiene fuerte impacto en la sociedad, entre otras cosas por su alta prevalencia. La medicina tradicional mexicana cuenta con un número importante de especies para el control de los pacientes diabéticos; entre ellas, *Cecropia obtusifolia* es una de las plantas utilizadas con mayor frecuencia. Preparados a base de la infusión de sus hojas poseen efecto hipoglucemiante demostrado tanto en modelos experimentales en el animal vivo como en estudios clínicos.

Los resultados han sido alentadores y han dado lugar a propuestas para el desarrollo de un fitomedicamento. Para ello, es imprescindible contar con el material vegetal factible de ser manipulado en su composición química para inducir la producción de ácido clorogénico e isoorientina, compuestos a los cuales se atribuye la actividad hipoglucemiante.

Una propuesta viable para la propagación continua de la especie y que asegure sus propiedades farmacológicas y el contenido de los principios activos es la micropropagación empleando tejido meristemático; por otro lado, el establecimiento *in vitro* del cultivo de células en suspensión facilitará la aplicación de técnicas de estrés específicas para la producción de fenoles y que redundará en la síntesis de ácido clorogénico e isoorientina.

## IV. HIPÓTESIS

La manipulación del tipo de explante, la combinación hormonal y la concentración de nitratos en el medio de cultivo, permitirán reproducir en las plantas micropropagadas las propiedades de *C. obtusifolia* silvestre e incrementar en los cultivos celulares la producción del ácido clorogénico e isoorientina.

## V. OBJETIVOS

### 1. Objetivo General

Establecer las condiciones *in vitro* para la propagación masiva de las plantas y el desarrollo de los cultivos de células en suspensión de *C. obtusifolia* que conserven la capacidad de producir los compuestos hipoglucemiantes ácido clorogénico e isoorientina.

### 2. Objetivos Particulares

1. Establecer las condiciones de cultivo para la obtención de callo a partir de explantes de hoja de planta aclimatada de *C. obtusifolia* variando la concentración de los diferentes fitorreguladores.
2. Evaluar la respuesta morfogénica de los explantes de hipocótilo, cotiledón, tallo y hoja expuestos a las mejores combinaciones de fitorreguladores según el objetivo anterior.
3. Multiplicar y aclimatizar las plántulas generadas *in vitro*, así como cuantificar la producción de ácido clorogénico e isoorientina en las plantas generadas.
4. Seleccionar líneas celulares de callos con mayor producción de ácido clorogénico e isoorientina.
5. Establecer el sistema de cultivo de células en suspensión a partir del cultivo de callo seleccionado.
6. Establecer las cinéticas de crecimiento y producción de ácido clorogénico e isoorientina en cultivos tipo-lote de células en suspensión variando las concentraciones de los nitratos en el medio MS.
7. Corroborar la actividad hipoglucemiante de las hojas de plantas obtenidos por micropropagación y de las biomásas celulares.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Colecta e identificación taxonómica del material vegetal**

El material vegetal (hojas, frutos y plantas) de *C. obtusifolia* “guarumbo” fue colectado en Cunduacán, Tabasco en agosto del 2003. Para la determinación taxonómica de los árboles se elaboraron ejemplares los cuales se depositaron en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social de México (IMSSM) para su identificación por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras (Directora del Herbario). Las plantas se transfirieron a bolsas de plástico con sustrato y se mantuvieron en un invernadero con riego controlado; posteriormente, se transfirieron a suelo en la parcela del Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIS-IMSS) en Xochitepec, Morelos (Figura 7).

### **2. Establecimiento de cultivos *in vitro***

#### **2.1. Preparación del cultivo aséptico**

Hojas jóvenes de *C. obtusifolia* se removieron de la planta aclimatada en la parcela del CIBIS-IMSS, se sumergieron en una solución jabonosa y consecutivamente en 300 mL de etanol al 70 % durante 3 min y 10 min en una solución al 1.2 % de hipoclorito de sodio y 0.2 % de Tween-20 (300 mL); finalmente, las hojas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (Figura 7).

De manera aséptica se cortaron secciones de hoja (explantes) de 5 mm<sup>2</sup>, excluyendo porciones apicales y basales. Los explantes se colocaron en medio de cultivo líquido de Murashige y Skoog (MS) al 50 % complementado con 15 g/L de sacarosa y 100 mg/L de cisteína (Murashige y Skoog, 1962). A continuación, se colocaron en papel filtro estéril para remover el exceso del medio de cultivo y enseguida se transfirieron a frascos de cultivo (250 mL) con 40 mL de medio de cultivo MS al 50 % complementado con 15 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar, adicionándole por filtración 50 mg/L de cloranfenicol (Sigma) y 4.5 mg/L de amfotericina B (Sigma). Finalmente, se incubaron a 26±2°C bajo fotoperiodo de 16 horas luz (32 µM/seg.m<sup>2</sup>) por 8 horas de oscuridad, una semana después fueron utilizados para inducir la formación de callo (Debergh y col., 1993).

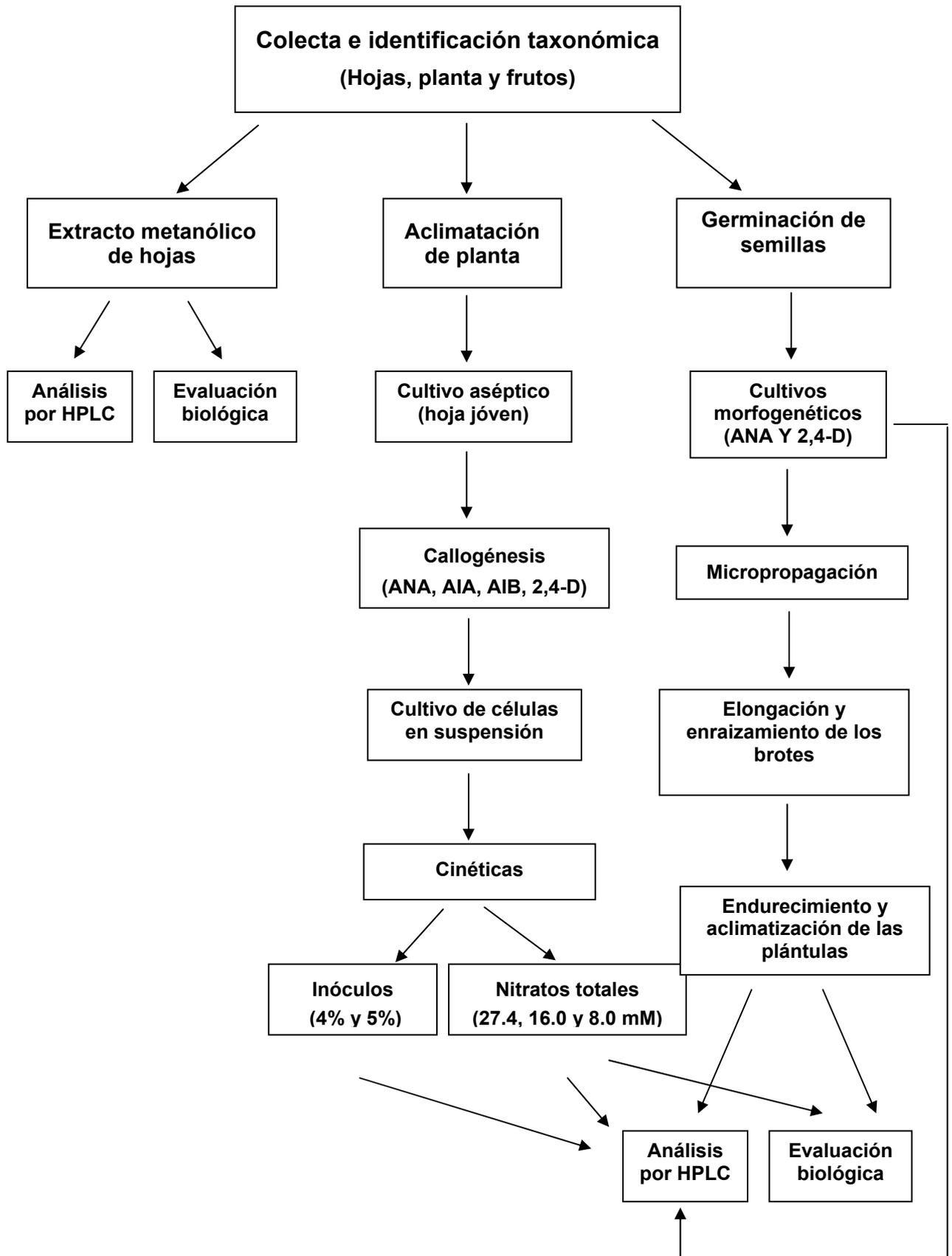


Figura 7. Diagrama de establecimiento de cultivos *in vitro*, análisis químico y evaluación biológica.

## 2.2. Germinación de las semillas del árbol silvestre

Después de 2 meses de colectadas, las semillas de *C. obtusifolia* se desinfectaron por inmersión en soluciones de 100 mL, primero de alcohol al 70 % durante 3 min bajo agitación constante, posteriormente se transfirieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1.2% y agitación durante 10 min. Posteriormente, las semillas se transfirieron a una unidad de filtración y se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril (Figura 7). Finalmente, las semillas fueron sembradas en frascos de cultivo (25 semillas por frasco) con algodón humedecido con agua y medio MS al 50 % complementado con 15 g/L de sacarosa. Las semillas se incubaron a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad y/o bajo fotoperiodo de 16 horas luz ( $32\ \mu\text{M}/\text{seg}.\text{m}^2$ ).

En otro experimento, previo a la desinfección, las semillas se hidrataron a temperatura ambiente durante 24 h y otras se sumergieron en agua caliente a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Después del periodo de hidratación, se transfirieron a frascos tarro con algodón humedecido con agua y medio MS al 50% complementado con 15 g/L de sacarosa; a la mitad de los frascos de este último tratamiento se adicionó ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ -2.89  $\mu\text{M}$ ) y se incubaron en las mismas condiciones.

El número de semillas germinadas en cada uno de los tratamientos se registró a los 20, 30 y 40 días de cultivo. Los resultados fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) factorial con el programa de estadística NCSS versión 5 (NCSS, 2001) y pruebas *a posteriori* de separación de medias por el método de Diferencia Mínima Significativa ( $\text{DMS}_{0.05}$ ).

Las plántulas emergidas fueron transferidas al medio de cultivo MS al 50% complementado con 15 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar para favorecer su elongación.

## 2.3. Callogénesis

Los explantes de hoja previamente desinfectados y no contaminados después de una semana se transfirieron a diferentes medios utilizando 30 explantes por tratamiento (5 explantes por frasco de cultivo). Como solución base se utilizó el medio de cultivo MS complementado con 30.0 g/L de sacarosa y 8.0 g/L de agar a pH 5.8; los diferentes tratamientos fueron derivados de las auxinas ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en tres diferentes concentraciones (4.46, 8.92 y 13.38  $\mu\text{M}$ ) combinadas con la citocinina

bencilaminopurina (BAP) en una concentración de 2.22  $\mu\text{M}$  (Gamborg y Phillips, 1995; Nath y col., 2001; Neves y col., 2001; Bourgaud y col., 2001; Nalawade y Tsay, 2004). Los explantes se incubaron a  $26\pm 2^\circ\text{C}$  bajo fotoperiodo de 16 horas luz ( $32 \mu\text{M}/\text{seg.m}^2$ ) por 8 horas de oscuridad y se transfirieron a nuevo medio cada 4 semanas hasta la obtención de callos (Figura 7).

Para evaluar el efecto de los reguladores del crecimiento se registró el número de explantes que respondieron a la formación de callo, las características de los callos formados, así como el peso fresco (PF) y seco (PS) obtenidos a las 4 y 8 semanas de cultivo tomando 10 explantes en cada ocasión. Los resultados fueron evaluados de acuerdo a un ANOVA factorial con el programa de estadística NCSS versión 5 (NCSS, 2001) y pruebas *a posteriori* de separación de medias por el método de Tukey<sub>0.05</sub> ( $q_i$ ).

### **2.3.1. Cultivos morfogénéticos**

Los explantes de hipocótilo, tallo, hoja y cotiledón derivados de plántulas obtenidas por germinación se sometieron a los mejores tratamientos para formación de callo, derivados de los explantes de hoja de planta aclimatada (2,4-D y ANA con la concentración de 8.92  $\mu\text{M}$  en combinación con BAP a 2.22  $\mu\text{M}$ ) e incubados bajo las mismas condiciones (Rout y col., 2000; Nalawade y Tsay, 2004).

La respuesta morfogénica de los diferentes explantes sometidos a los reguladores de crecimiento fue evaluada cada 4 semanas registrando la formación de tejido desdiferenciado (callo), así como morfogénesis por la generación de raíces o brotes (Figura 7).

## **2.4. Micropropagación**

### **2.4.1. Elongación y enraizamiento de los brotes**

Los brotes generados fueron transferidos al medio de cultivo MS libre de hormonas, complementado con sacarosa 15 g/L y agar 8 g/L a pH de 5.5. Los cultivos fueron incubados en las mismas condiciones anteriormente mencionadas (Rout y col., 2000; Nalawade y Tsay, 2004).

#### **2.4.2. Endurecimiento y aclimatización de las plántulas**

Para aclimatizar las plántulas generadas *in vitro*, cuando las partes aéreas de éstas alcanzaron 5 cm de altura, las raíces se lavaron con agua para eliminar el medio nutritivo, inmediatamente después fueron sumergidas en una mezcla preventiva de fungicidas [(0.5 g/L de ridomil (Novartis Metalaxil-M (4.5%) y clorotalonil (72%) y bactericidas (0.5 g/L de agrimicina (100 TSIZER-estreptomocina (18.65%) y oxitetraciclina (2%)] durante 3 min (Figura 7).

Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a vasos de unicel, con sustrato comercial estéril Sunshine Mezcla fina (70-80% de turba Canadiense Esfagnacea, vermiculita, piedra caliza yeso y agente humectante), abonadas con el fertilizante comercial Peters (0.6 g/L). Los vasos se taparon con bolsas de polietileno transparente y se colocaron en el incubador a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , bajo fotoperiodo de 16 horas luz (intensidad luminosa de  $32\ \mu\text{M}/\text{seg}\cdot\text{m}^2$ ) por 8 horas de oscuridad durante una semana; teniendo cuidado de mantener húmedo el interior de la bolsa (Rout y col., 2000).

Al cabo de una semana se retiró la bolsa de plástico y las plántulas se conservaron aún en el cuarto de cultivos 7 días más. A continuación se trasladaron al invernadero bajo condiciones controladas de temperatura ( $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), humedad (pared húmeda) y riego por aspersión a una intensidad luminosa de  $1110\ \mu\text{M}/\text{seg}\cdot\text{m}^2$ ; en esta fase, las plantas fueron fertilizadas semanalmente. Cuando las plantas alcanzaron alturas de 10 y 30 cm se transfirieron a bolsas de polietileno negras de 11x23 cm y 30x34 cm, respectivamente, utilizando una mezcla de sustrato comercial y tierra de hoja (proporciones de 2:1). Se colocaron en otro invernadero bajo la misma intensidad luminosa, temperatura de  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , condiciones controladas de riego y fertilización cada 2 semanas. En esta fase se registró la longitud de las plantas, el grosor del tronco, el número de hojas lanceoladas y lobuladas a los 2, 3 y 6 meses de desarrollo (Rout y col., 2000).

#### **2.5. Cultivo de células en suspensión**

El cultivo de células en suspensión de *C. obtusifolia* se inició transfiriendo 2.4 g de biomasa fresca, de callos derivados de hoja, en 80 mL de medio de cultivo MS líquido complementado con sacarosa 30 g/L y las hormonas 2,4-D ( $8.92\ \mu\text{M}$ ) en combinación con BAP ( $2.22\ \mu\text{M}$ ). Los cultivos se incubaron a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , bajo fotoperiodo de 16 horas luz

(intensidad luminosa de  $32 \mu\text{M}/\text{seg.m}^2$ ) por 8 horas de oscuridad en un agitador orbital a 110 rpm (Rout y col., 2000; Bourgaud y col., 2001; Nalawade y Tsay, 2004).

El desarrollo de las suspensiones se evaluó registrando las características de color, disgregación del callo y crecimiento durante el establecimiento de la suspensión celular. La biomasa celular se filtró en condiciones de esterilidad cada 3 semanas y fue subcultivada en el mismo medio y condiciones de cultivo (Figura 7).

### **2.5.1. Cinéticas de crecimiento**

Los parámetros de crecimiento determinados en cultivos en lote fueron: la velocidad específica, el tiempo de duplicación, índice de crecimiento y biomasa máxima, tomando 3 matraces cada 3 días (10-16 puntos) en cada lote. Como parámetros de medición se utilizó el registro del peso fresco (PF) y seco (PS) (Quintero, 1990; Kieran y col., 1997; Gómez-Kosky, 1998; Mühlbac, 1998). Con este propósito, la suspensión celular de cada matraz se filtró al vacío en un embudo Büchner (papel Whatman No. 1, 5 cm de diámetro) y la biomasa se lavó con agua destilada para eliminar los residuos del medio; después de medir el PF, la biomasa se secó a temperatura ambiente y se determinó el PS. Tanto en la biomasa seca como en el medio de cultivo se analizó el contenido de AC e ISO (Figura 7).

### **2.5.2. Optimización de las condiciones de cultivos en suspensión**

#### **2.5.2.1. Concentración del inóculo**

La densidad del inóculo tiene una influencia relevante en la iniciación del crecimiento de suspensiones celulares y determina el patrón de crecimiento y duración de cada fase (Quintero, 1990; Gómez-Kosky, 1998; Kieran y col., 1997; Mühlbac, 1998). El efecto del tamaño del inóculo se evaluó manejando biomazas iniciales del 4 y 5% (Figura 7).

#### **2.5.2.2. Concentración de nitratos en el medio**

La concentración total de nitratos (27.4 mM de nitrato de amonio y de potasio) en el medio MS, se modificó reduciendo su contenido a 16.0 mM y 8.0 mM (Figura 7). Al igual

que las cinéticas anteriores, se tomaron muestras en el mismo período registrando y evaluando los mismos parámetros (Fritz y col., 2006). Las biomásas máximas obtenidas fueron comparadas de acuerdo a un ANOVA con el programa de estadística NCSS versión 5 (NCSS, 2001).

### **3. Análisis de los metabolitos secundarios por HPLC**

#### **3.1. Obtención de extractos metanólicos**

Hojas secas y molidas de árboles silvestres, planta aclimatada de un año de edad, así como de las plantas micropropagadas de 1, 2, 3 y 6 meses de desarrollo, fueron extraídas de manera individual. Las muestras se maceraron en metanol grado reactivo (Merck) en una relación 1:10 (p/v), a temperatura ambiente durante 24 horas, repitiendo el proceso tres veces (Figura 7). Los extractos de cada muestra se filtraron, se llevaron a sequedad a presión reducida en un rotaevapor (Büchi R-124) y se determinó el rendimiento para su posterior almacenamiento a 3°C (Nicasio y col., 2005). Muestras de los extractos metanólicos se maceraron en cloroformo (25 mg/mL), a temperatura ambiente por 24 h. Después de filtrar, el residuo vegetal se extrajo con metanol (10 mg/mL) y los extractos se filtraron (Whatman, PWDF 0.45  $\mu\text{m}$ ) para su análisis por HPLC a  $\lambda = 254 \text{ nm}$  (Nicasio y col., 2005).

En el caso de las biomásas de callos y de las células en suspensión, el material vegetal se extrajo tres veces consecutivas con metanol (1:10 g/mL). Luego de filtrar y de llevar a sequedad a presión reducida, los extractos se recuperaron con metanol (10 mg/mL) y se filtraron (Whatman, PWDF 0.45  $\mu\text{m}$ ) para su análisis por HPLC a  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

#### **3.2. Condiciones para el análisis por HPLC**

Para el estudio se utilizó un equipo Waters 996 con bombas binarias (2695) acoplado a un detector de arreglo de diodos (2696) con un rango de detección de 190 a 600 nm y operado por el sistema Millennium System Manager Software (Empower 1). En el estudio se utilizó una columna Chromolith Performance RP-18e (100 mm  $\times$  4.6 mm, Merck). La

separación cromatográfica se realizó por medio de un sistema de elución por gradientes con A= H<sub>2</sub>O-0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y B= CH<sub>3</sub>CN-CH<sub>3</sub>OH (1:1) manteniendo un flujo constante de 1 mL/min de acuerdo al siguiente esquema: 3min = 90% A; el gradiente se cambia a 80% A (10min), a 60% A (15 min), a 40% A (2 min), a 10% A (5 min), a 90%A (2 min) y se sostiene 3 min en 90 % de A (Figura 7). La valoración de las muestras se realizó por medio de la comparación con referencias comerciales obteniendo curvas de calibración con soluciones de 20, 40, 80 y 160 µg/mL de los compuestos AC (Sigma) e ISO (Indofine) disueltas en metanol (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2001, Nicasio y col., 2005).

Los contenidos de AC e ISO en hojas de árboles y en los cultivos de células en suspensión desarrollados con diferentes contenidos de nitratos en el medio fueron evaluados de acuerdo a un ANOVA con el programa de estadística NCSS versión 5 (NCSS, 2001) y se hicieron pruebas *a posteriori* de separación de medias por el método de Tukey<sub>0.05</sub> (q<sub>t</sub>).

#### **4. Actividad hipoglucemiante de los productos**

Para evaluar el efecto hipoglucemiante de los extractos metanólicos se utilizaron ratones Balb-C sanos, machos, con pesos corporales de 22-24 g. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos de 8 individuos cada uno.

Previo ayuno de 6 h, los extractos metanólicos de las plantas disueltos en agua se administraron por vía oral en dosis de 1.0 y 0.5 g/Kg de peso, en un volumen de 200 µL; al grupo control se les administró el mismo volumen del vehículo (negativo) y el positivo recibió glibenclamida (Sigma) a dosis de 5 mg/Kg (Paz y col., 2003). Los extractos de los callos y suspensiones disueltos en agua se administraron en dosis de 0.5 g/Kg de peso en un volumen de 200 µL (Nicasio y col., 2005). Las muestras de sangre se colectaron de la vena caudal, antes y después de 30, 60 y 120 min de la administración de los extractos de las plantas y del vehículo. En el caso de los extractos metanólicos de los callos y suspensiones, se obtuvieron muestras antes y cada 2 h después del tratamiento (o el vehículo). Las muestras se colocaron en criotubos y se centrifugaron a 7500 rpm en una centrífuga clínica 5417 C durante 7 min; los sueros se mantuvieron en congelación a 0°C para la cuantificación posterior de los niveles de glucosa (Nicasio y col., 2005).

#### **4.1. Determinación de los niveles de glucosa sérica**

Para cuantificar la glucosa en las muestras se utilizaron juego de reactivos comerciales (Wiener Lab.) siguiendo las instrucciones establecidas. Brevemente, a 5  $\mu$ L de la muestra de suero se adicionaron 5 mL del reactivo, se agitaron las muestras, se incubaron 5 min a 37°C y se leyeron en un espectrofotómetro (Milton Roy 1201) a una longitud de onda de 505 nm. Las concentraciones de glucosa sérica se calcularon empleando una curva de calibración con glucosa (DX-5 PISA, inyectable al 5%, Sector Salud).

Los resultados obtenidos se evaluaron aplicando un ANOVA factorial con el programa de estadística NCSS versión 5 (NCSS, 2001) y se hicieron pruebas *a posteriori* de separación de medias por el método de Tukey<sub>0.05</sub> ( $q_t$ ).

## VII. RESULTADOS

### 1. Colecta e identificación taxonómica del material vegetal

El material vegetal colectado (Figura 8) fue identificado taxonómicamente como *C. obtusifolia* y se registró el ejemplar de herbario (IMSSM) con el número 14123.



Figura 8. Material de *C. obtusifolia* colectado en Cunduacán, Tabasco.

### 2. Establecimiento de los cultivos *in vitro*

#### 2.1. Preparación del cultivo aséptico

El cultivo aséptico en un 100% se logró establecer empleando explantes de hojas jóvenes del árbol de *C. obtusifolia* adaptado de 1 m de altura (Figura 9), el cual se utilizó posteriormente para iniciar el proceso de calogénesis.



Figura 9. Árbol de *C. obtusifolia* aclimatado en el Estado de Morelos.

## 2.2. Germinación de semillas del árbol silvestre

Bajo las condiciones establecidas, los porcentajes de germinación de las semillas fueron bajos (<20%), las semillas recién colectadas, alcanzaron el 100% de germinación a las 2 semanas de cultivo (Figura 10). La germinación en los diferentes medios nutritivos utilizados y las condiciones de tratamiento (prehidratación y  $GA_3$ ) no fue significativamente diferente (Figura 10); por el contrario, las diferencias significativas se determinaron en el tiempo que tardaron las semillas en germinar ( $F_{0.05,2} = 3.035$ ;  $p < 0.05$ ), observándose a los 30 días de cultivo ( $DMS_{0.05} = 0.954$ ) el número mayor de semillas germinadas. La inmersión previa de las semillas en agua estéril a temperatura ambiente o a  $50^\circ C$  no estimuló el proceso de germinación, tampoco las condiciones de incubación empleadas, que están entre las temperaturas de  $16-32^\circ C$  y luz solar, que son consideradas como las condiciones óptimas para la germinación en el hábitat de origen.

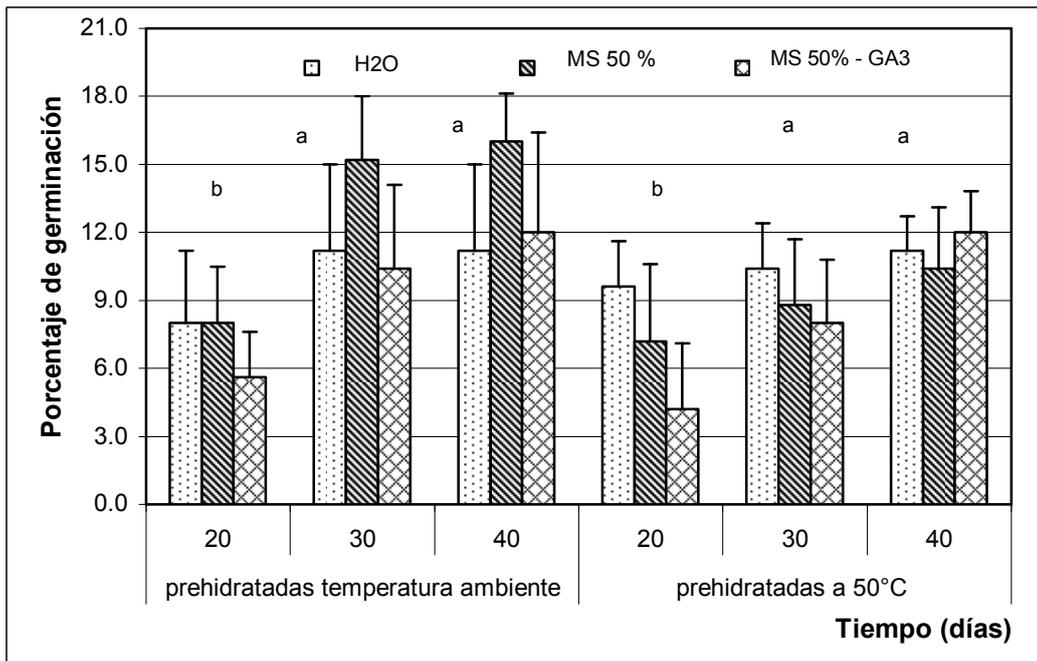


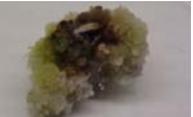
Figura 10. Germinación de semillas de *C. obtusifolia* en diferentes condiciones de tratamiento e incubación. Los promedios con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de separación de medias  $DMS_{0.05} = 0.954$ .

### 2.3. Calogénesis

Los explantes de hoja del árbol aclimatado respondieron al proceso de inducción de callos en el medio de cultivo con todas las hormonas utilizadas, principalmente cuando el medio se complementó con las auxinas ANA y 2,4-D. Por el contrario, los explantes que se sometieron a los tratamientos con las auxinas AIA y AIB se oxidaron y el 100% de ellos murieron al ser tratados con  $8.92 \mu\text{M}$  de AIA y 43% al utilizar  $13.38 \mu\text{M}$  de AIB. Al inicio, los callos presentaron color amarillo verdoso y consistencia dura, tornándose friables después del tercer subcultivo. En general, los callos presentaron raíces adventicias, principalmente cuando en los tratamientos se adicionó AIB (Figura 11).

Con base en el ANOVA factorial de los pesos frescos ( $F_{0.05,3} = 12.27$ ;  $p=0.0001$ ) y secos ( $F_{0.05,3} = 8.11$ ;  $p=0.0001$ ) de las biomásas de callo a las 4 y 8 semanas de cultivo (Figuras 12), se determinó que las mayores biomásas de callo se obtuvieron al utilizar las auxinas 2,4-D y ANA (Tukey  $qt, 0.05 = 826.87$  PF; Tukey  $qt, 0.05 = 60.94$  PS).

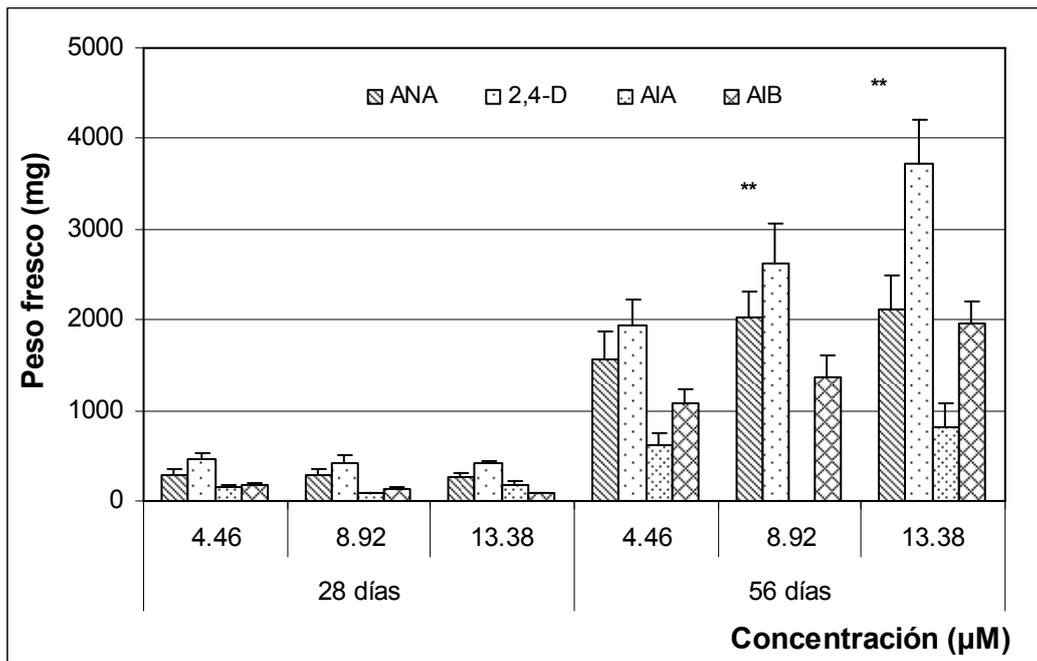
Los tipos principales de cultivos de callos de color verde pardo fueron los rizogénicos derivados con las hormonas ANA y AIB y los friables con la hormona 2,4-D (Figura 13). Las características de los cultivos se conservaron en los subcultivos siguientes.

Fitorregulador ( $\mu\text{M}$ )	ANA	2,4-D		AIB
4.46				
8.92			ND	
13.38				

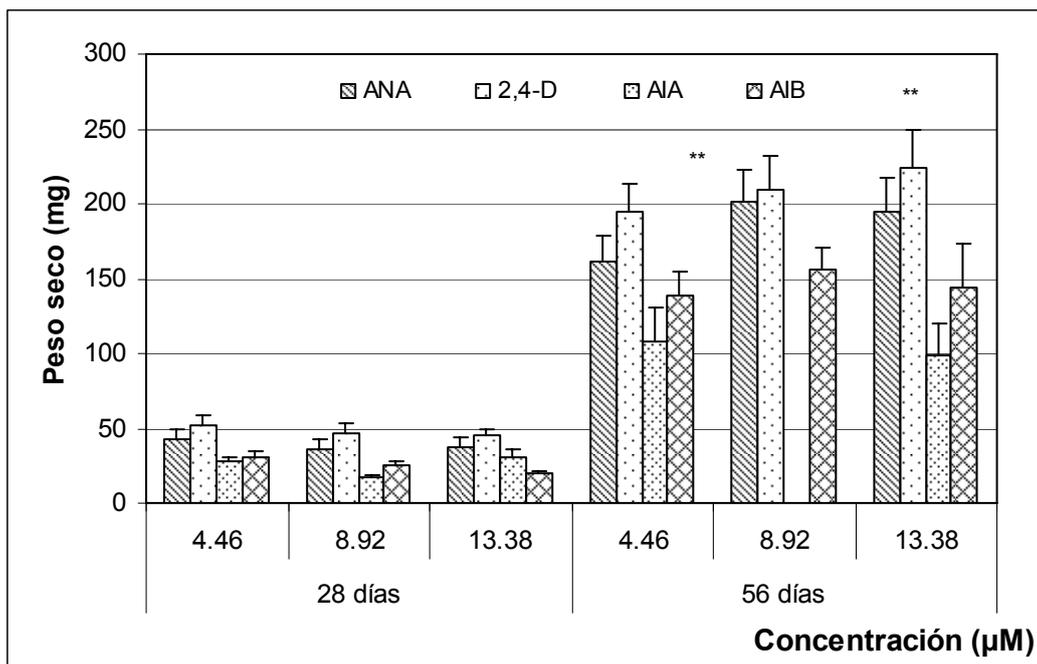
—— 2 cm

**ND:** No hubo desarrollo

Figura 11. Efecto de las auxinas sobre el crecimiento de los callos de explantes de hoja del árbol aclimatado de *C. obtusifolia* después de 8 semanas de cultivo.



(a)  $q_{t \text{ hormona}} = 826.87$  (Tukey)



(b)  $q_{t \text{ hormona}} = 60.94$  (Tukey)

\*\*altamente significativo ( $p < 0.05$ )

Figura 12. Efecto de las auxinas sobre el crecimiento en peso fresco (a) y seco (b) de callos después de 4 y 8 semanas de cultivo derivados de explantes de hoja del árbol aclimatado de *C. obtusifolia*.

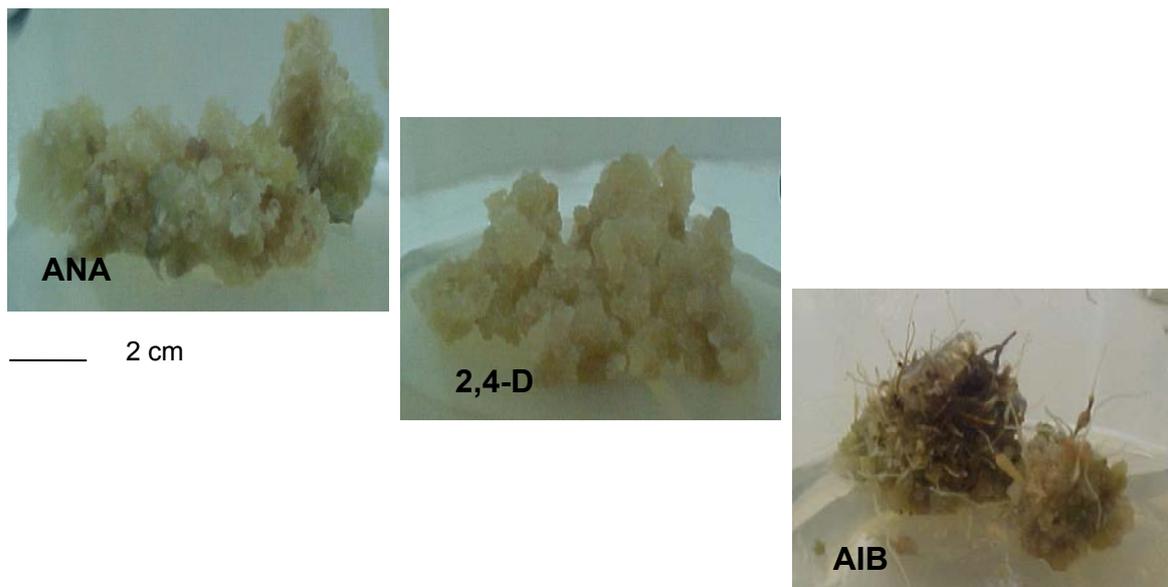


Figura 13. Cultivos de callos derivados con diferentes auxinas ( $13.38 \mu\text{M}$ ) a partir de explantes de hoja del árbol aclimatado de *C. obtusifolia*.

#### 2.4. Cultivo de callos morfogenéticos

En el medio complementado con 2,4-D, todos los explantes (hoja, tallo, hipocótilo y cotiledón) de las plántulas obtenidas *in vitro* generaron callos con raíces; por el contrario, en presencia de ANA, la respuesta varió según el explante utilizado: el hipocótilo, la hoja y el cotiledón formaron callos morfogénicos con abundantes raíces adventicias, grandes de color blanco. En cambio, 75% de los explantes de tallo formaron callos simples y el 25% restante formó callos con brotes (Figura 14). El número de los brotes fue variable, en promedio de 2 a 3 brotes por explante con un máximo de 16.

El subcultivo de los callos en las mismas condiciones conservó la capacidad de brotación múltiple y de tejido desdiferenciado. Empleando la auxina 2,4-D se obtuvo un cultivo de callos rizogénicos para cada tipo de explante, y con ANA, se establecieron 2 líneas celulares de callos derivadas de tallo y hoja presentando esta última, raíces adventicias (Figura 14).

Explante	2,4-D (8.92 $\mu$ M)			ANA (8.92 $\mu$ M)		
	Callo	Brotes	Raíces	Callo	Brotes	Raíces
Hoja		ND	ND		ND	
Cotiledón		ND	ND	ND	ND	
Hipocótilo		ND	ND	ND	ND	
Tallo		ND	ND			ND

—— 2 cm

ND = No hubo desarrollo

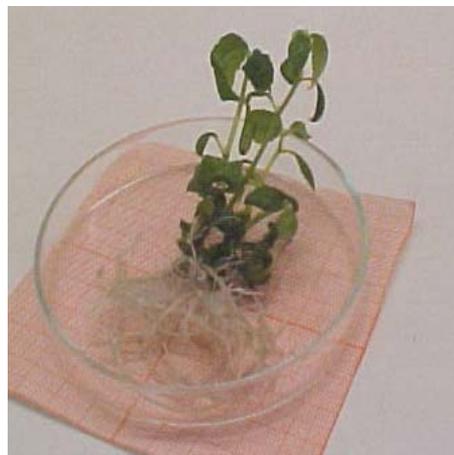
Figura 14. Efecto de las auxinas 2,4-D y ANA sobre la respuesta morfogénica de los explantes de plántulas de *C. obtusifolia* después de 8 semanas de cultivo.

## 2.5. Elongación y enraizamiento de los brotes

Todos los brotes se elongaron y respondieron al proceso de rizogénesis *in vitro* en el medio MS al 50% libre de hormonas formando plántulas. Después de 2 meses (Figura 15), las plántulas aclimatizadas en condiciones de la cámara de cultivos presentaron como promedio  $6.4 \pm 0.9$  cm de longitud, un número de  $7.5 \pm 1.8$  de hojas lanceoladas y

3.3±1.2 de raíces primarias, de las cuales, las más grandes presentaron una longitud promedio de 8.6±2.6 cm.

Figura 15. Plántulas de 2 meses obtenidas de los brotes desarrollados en explantes de tallo con ANA (8.92 µM) en combinación con BAP (2.22 µM).



## 2.6. Endurecimiento y aclimatización de las plántulas

Las plántulas de *C. obtusifolia* generadas *in vitro* fueron exitosamente adaptadas a las condiciones de invernadero (140 ejemplares) y de campo (100 ejemplares); en la Figura 16 se representa el proceso de aclimatización. Todas las plántulas sobrevivieron después de 4 semanas de haber sido trasplantadas e incubadas en el invernadero y no mostraron variaciones morfológicas entre la población durante este proceso. Algunos de los parámetros de crecimiento considerados durante el desarrollo de las plantas a los 2, 3 y 6 meses se muestran en la Tabla 2. Las plantas en el cuarto de cultivo presentaron una tasa de crecimiento de 1.5 cm mensual, parámetro que incrementó a 3.3 cm al ser trasplantadas a tierra en condiciones de invernadero y a 6.4 cm al ser expuestas totalmente a las condiciones climáticas tales como iluminación, temperatura, humedad, etc. El incremento en la longitud del tallo fue superior al de los árboles aclimatado y silvestre de *C. obtusifolia* (Conabio, 2008).

En condiciones de invernadero, las hojas de las plantas son lanceoladas durante el proceso de crecimiento y su lobulación comenzó a los 3 meses de su aclimatación; sin embargo, al exponer las plantas a las condiciones del medio ambiente, el 95% desplegaron hojas lobuladas, fenómeno que es característico en los árboles silvestres (Conabio, 2008). El diámetro del tallo y el número de las hojas se duplicó después de 6

meses de desarrollo bajo condiciones ambientales; el incremento en el diámetro (2 cm por año) del tallo fue similar al de los árboles silvestres de *C. obtusifolia* (Conabio, 2008).



Plántula (2 mese *in vitro*)

1 mes



2 meses

3 meses

6 meses

Figura 16. Proceso de aclimatización de las plántulas de *C. obtusifolia*.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento de las plantas de *C. obtusifolia* micropropagadas.

Edad (meses)	Longitud del tallo (cm)	Grosor del tallo (cm)	Número de hojas	Emergencia lobular (%) y número de hojas lobuladas
2	8.7±3.7	1.0±0.3	5.9±2.6	-----
3	12.4±3.9	1.0±0.3	6.4±1.2	(13.6%) 1.0±0.0
6	31.7±10.0	1.9±0.4	9.1±1.4	(95%) 2.1±1.4

n=10

## 2.7. Cultivo de células en suspensión

Los callos utilizados para establecer los cultivos de células en suspensión fueron biomásas celulares friables de color verde pardo. Al ser transferidas al medio líquido, las células se aglomeraron y formaron agregados duros que se disgregaron o eliminaron al momento de cada subcultivo, obteniéndose la línea de células en suspensión de color verde pardo, la cual presentó células libres y en agregados pequeños (Figura 17).

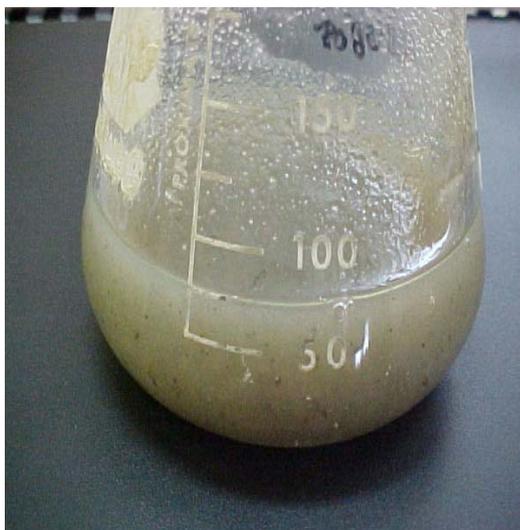


Figura 17. Cultivo de células en suspensión de *Cecropia obtusifolia* empleando un inóculo del 5% de callos derivados de explantes de hoja con 2,4-D (8.92  $\mu\text{M}$ ) y BAP (2.22  $\mu\text{M}$ ).

### 2.7.1. Optimización de las condiciones de cultivo

#### 2.7.1.1. Concentración del inóculo

Las cinéticas establecidas para el cultivo de células en suspensión tipo lote aplicando inóculos de 4% y 5%, presentaron fases de adaptación de 15 y 9 días respectivamente. Posterior a esos periodos, se dió inicio a la fase de crecimiento logarítmico obteniéndose las biomásas máximas el día 33 en el caso del inóculo de 4% y el día 30 con el inóculo de 5% (Figura 18, Tabla 3). Asimismo, las constantes cinéticas (tiempo de duplicación, velocidad específica y el índice de crecimiento) no fueron significativamente diferentes

entre ambos inóculos. Los rendimientos de las biomásas celulares con respecto a la fuente de carbono fueron también similares (Tabla 4).

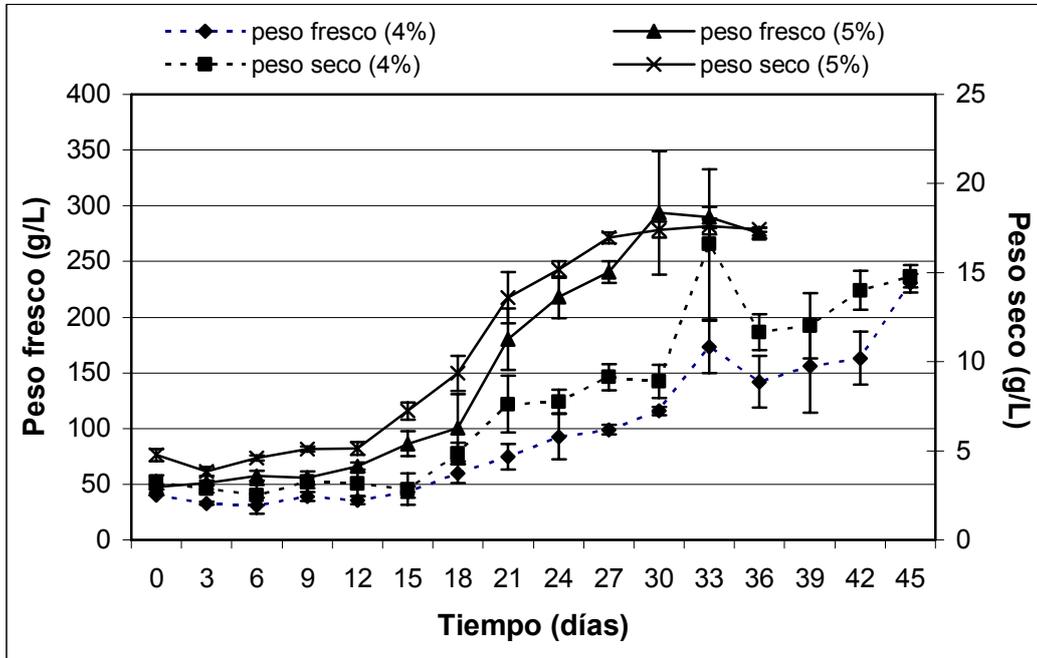


Figura 18. Cinéticas de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *C. obtusifolia* a partir de inóculos del 4 % y 5 % en peso fresco iniciados con callos derivados de explantes de hoja del árbol aclimatado.

Con el inóculo del 4%, en la fase de adaptación de los cultivos en suspensión se produjo una disminución del pH, alcanzando el día 9 el valor más bajo ( $5.19 \pm 0.13$ ). Posteriormente, este parámetro se incrementó a  $6.62 \pm 0.07$  en la fase de crecimiento logarítmico cuando la biomasa era máxima, manteniéndose en  $5.40 \pm 0.19$  durante la fase estacionaria. Los cultivos con el inóculo del 5% presentaron un perfil del pH similar al descrito, con valores de  $5.00 \pm 0.03$  el día 9 y de  $5.55 \pm 0.08$  al alcanzar la biomasa máxima, finalizando el cultivo con cifras de  $5.52 \pm 0.17$  el día 36 (datos no ilustrados).

Tabla 3. Constantes cinéticas de los cultivos de células en suspensión de *C. obtusifolia* obtenidos con inóculos del 4% y 5% en peso fresco (PF).

Inóculo		Biomasa máxima (g/L)	Tiempo* (días)	Índice de crecimiento	Tiempo de duplicación (días)	$\mu_{max}^{**}$ (días <sup>-1</sup> )	Rendimiento g de biomasa/g de sacarosa
%	(g/L)						
4	40 (PF)	173.1	33	3.3	5.3	0.13	-
	3.2 (PS)	16.6	33	4.2	5.8	0.12	0.55
5	48 (PF)	293.7	30	5.1	3.6	0.19	-
	3.8 (PS)	17.6	30	3.6	5.6	0.11	0.59

\* Tiempo al cual se alcanza la biomasa máxima; \*\* Velocidad específica de crecimiento máxima. (PS) peso seco; (PF) peso fresco

### 2.7.1.2. Concentración de nitratos en el medio

Manejando un inóculo del 5%, la concentración total de nitratos en el medio de cultivo de las suspensiones celulares se redujo a 16.0 mM y 8.0 mM, con el propósito de favorecer el metabolismo secundario. Al reducir a 16.0 mM la concentración en los cultivos tipo lote, el crecimiento celular en la fase logarítmica fue similar al establecido en el medio de cultivo completo (27.4 mM); sin embargo, disminuyó en la fase estacionaria. Con la concentración de 8.0 mM de nitratos totales, el cultivo presentó una cinética diferente a las obtenidas con 16.0 y 27.4 mM de nitratos, dado que el crecimiento celular se sostuvo a lo largo del período de cultivo sin que se alcanzara la fase estacionaria (Figura 19).

Los parámetros de crecimiento sometidos al análisis de varianza demostraron que no existen diferencias significativas entre las biomásas máximas ( $F_{0.05,2}=2.45$ ,  $p=0.167$ ) y finales ( $F_{0.05,2}=0.80$ ;  $p=0.498$ ) obtenidas con las tres condiciones de nitratos en el medio.

Tanto el índice de crecimiento, como el tiempo de duplicación y el rendimiento, disminuyeron conforme disminuyó la concentración de nitratos; por el contrario, se incrementó la velocidad específica del crecimiento celular (Tabla 4).

Al bajar el contenido de nitratos a 16.0 mM, el pH del cultivo inicial tuvo un valor de  $5.31 \pm 0.09$  y disminuyó a  $4.97 \pm 0.07$  en los primeros cinco días de la fase de adaptación para incrementarse en esta misma fase hasta  $5.38 \pm 0$ . Durante el crecimiento logarítmico el pH fue de  $5.98 \pm 0.08$ . En la fase estacionaria, el crecimiento celular fue menor, y se determinó un pH desde neutro ( $7.05 \pm 0.06$ ) hasta básico al final del cultivo ( $7.36 \pm 0$ ). Bajando la concentración de los nitratos a 8.0 mM, el pH al inicio del cultivo fue de  $5.44 \pm 0.02$ , disminuyó también en los cinco primeros días de la fase de adaptación hasta  $4.66 \pm 0.11$  y se incrementó en la misma etapa a  $4.98 \pm 0.04$ . Durante la fase de crecimiento logarítmico el pH subió a  $5.66 \pm 0.14$  y a lo largo de la fase estacionaria osciló entre  $5.57 \pm 0.25$  y  $5.92 \pm 0.05$  (datos no ilustrados).

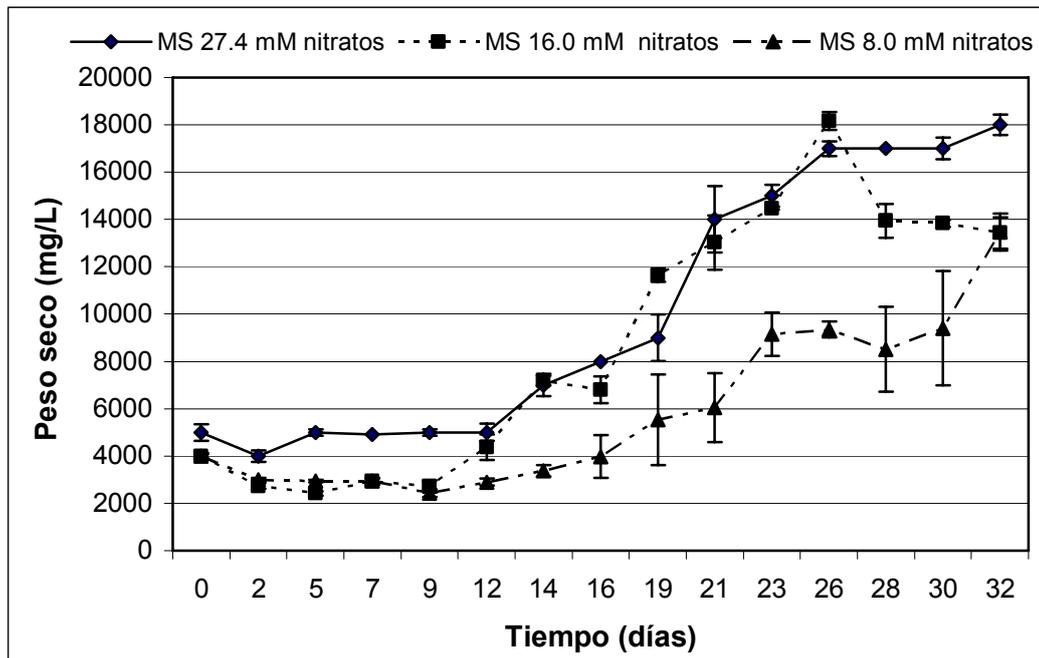


Figura 19. Cinéticas de crecimiento de las células en suspensión con distintas concentraciones de nitratos en el medio MS.

Tabla 4. Constantes cinéticas de los cultivos de células en suspensión de *C. obtusifolia* en medio MS complementado con concentraciones variables de nitratos.

Contenido de nitratos totales	Biomasa máxima (g/L)	Índice de crecimiento	Tiempo de duplicación (días)	$\mu_{max}$ (días <sup>-1</sup> )	Rendimiento g de biomasa/g de sacarosa
27.4 mM	17.6	3.7	5.60	0.11	0.59
16.0 mM	18.17	3.5	3.88	0.18	0.60
8.0 mM	13.46	1.9	3.33	0.21	0.45

### 3. Análisis del contenido de los metabolitos secundarios

#### 3.1. Referencias de AC e ISO

El sistema de gradientes utilizado permitió la separación de los compuestos AC e ISO con tiempos de retención de 7.12 min y 15.45 min respectivamente (Figura 20).

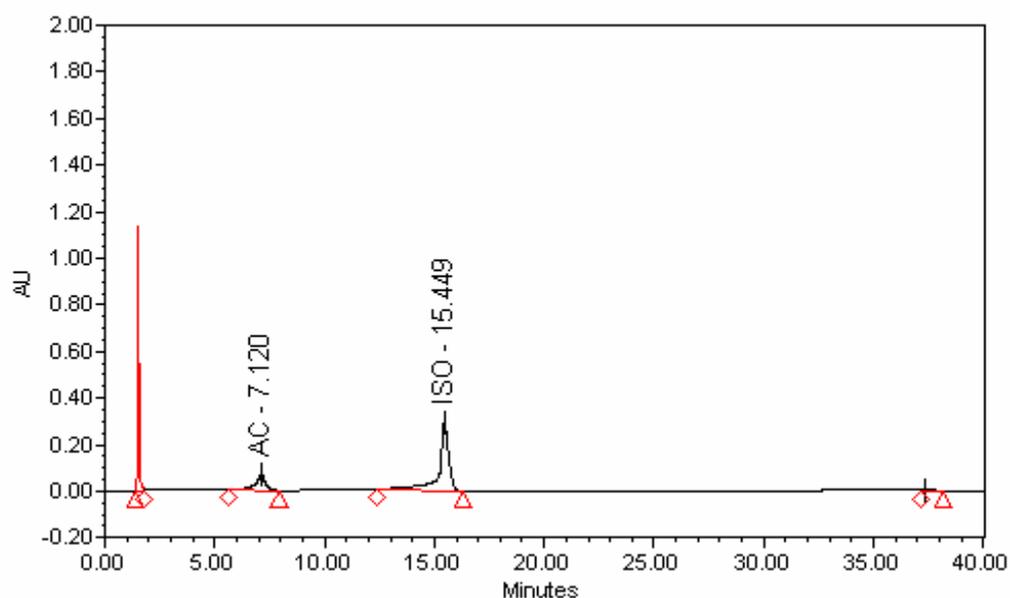


Figura 20. Perfil cromatográfico ( $\lambda = 254$  nm) de los estándares comerciales de AC e ISO.

### 3.2. Concentraciones de AC e ISO en los cultivos de callos

Es bien conocido que las células vegetales son totipotenciales y pueden producir todos los compuestos originalmente encontrados en las plantas. En los cultivos de callos derivados de los explantes de hojas de *C. obtusifolia* silvestre y adaptada sólo se detectó AC, uno de los dos compuesto de interés en este estudio. En las diferentes líneas celulares muestreadas se registró una señal con un tiempo de retención de 10 min que corresponde al ácido ferúlico (Figura 21), compuesto que no se detectó en los extractos de las plantas silvestre, aclimatada y micropropagada.

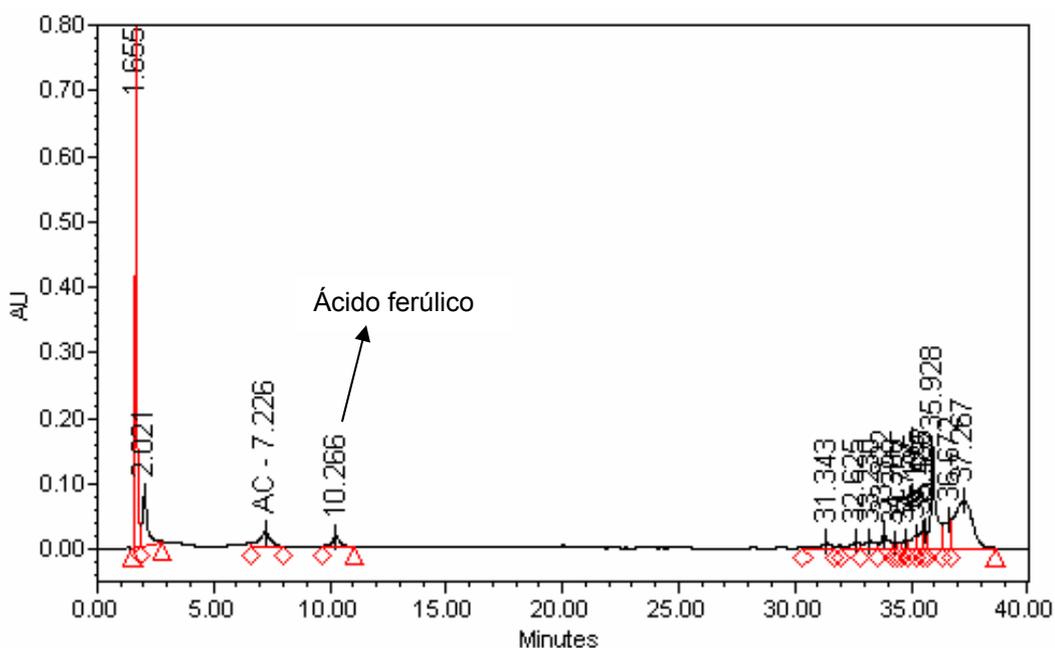


Figura 21. Perfil cromatográfico ( $\lambda = 254$  nm) del extracto metanólico de un cultivo de callo de *C. obtusifolia*.

Las concentraciones de AC fueron similares en las diferentes líneas celulares. Es importante señalar que las concentraciones de AC disminuyeron al incrementarse el número de los subcultivos; sin embargo, después del cuarto cambio, las concentraciones se mantuvieron constantes (Tabla 5). Los niveles más altos de AC se registraron en los cultivos de callos rizogénicos generados con los explantes de tallo y hoja que fueron expuestos a la hormona ANA (Tabla 6).

Tabla 5. Efecto de las auxinas en la acumulación del AC en los cultivos de callos derivados de explantes de hoja del árbol aclimatado de *C. obtusifolia*.

Concentración del fitoregulador ( $\mu\text{M}$ )	Número de subcultivos	ANA	2,4-D	AIB
		AC (mg/g callo)		
<b>4.46</b>	2	3.98 $\pm$ 1.21	3.34 $\pm$ 0.33	1.04 $\pm$ 0.04
	3	2.13 $\pm$ 0.03	1.86 $\pm$ 0.11	
	4	NA	2.13 $\pm$ 0.03	
	6	1.55 $\pm$ 0.19	1.91 $\pm$ 0.06	
	7	1.48 $\pm$ 0.01	1.64 $\pm$ 0.01	
<b>8.92</b>	2	3.04 $\pm$ 0.07	3.00 $\pm$ 0.07	3.98 $\pm$ 0.33
	3	2.13 $\pm$ 0.03	1.84 $\pm$ 0.26	
	4	1.84 $\pm$ 0.26	2.13 $\pm$ 0.03	
	6	1.51 $\pm$ 0.01	1.91 $\pm$ 0.06	
	7	1.36 $\pm$ 0.38	2.11 $\pm$ 0.10	
<b>13.38</b>	2	2.17 $\pm$ 0.13	0.82 $\pm$ 0.05	1.16 $\pm$ 0.01
	3	1.70 $\pm$ 0.11	1.30 $\pm$ 0.07	
	6	1.30 $\pm$ 0.07	NA	
	7	2.02 $\pm$ 0.15	1.70 $\pm$ 0.11	

NA= no fue analizado

Tabla 6. Efecto de las auxinas y el tipo de explante en la acumulación de AC en los cultivos de callos de *C. obtusifolia*.

Número de subcultivos	Fitorregulador (8.92 µM)	AC (mg/g callo)			
		Hipocótilo	Cotiledón	Tallo	Hoja
1	<b>2,4-D</b>	NA	NA	NA	0.89±0.11
2		1.10±0.03	1.41±0.13	NA	1.44±0.16
3		1.12±0.02	1.46±0.01	1.22±0.09	1.08±0.07
4		1.12±0.03	1.74±0.17	2.25±0.12	1.97±0.03
5		1.66±0.08	1.45±0.03	3.50±0.01	1.21±0.05
6		2.07±0.01	1.19±0.15	NA	1.78±0.03
1	<b>ANA</b>			3.69	1.25
2				NA	1.96±0.16
3				3.57±0.05	4.77±0.03
4				2.61±0.18	4.17±0.61

**NA=** no fue analizado.

### 3.3. Concentraciones de AC e ISO en los cultivos en suspensión

A diferencia de los cultivos de callos, los de células en suspensión sintetizaron los compuestos AC e ISO. Las concentraciones de ambos compuestos en estos cultivos variaron de acuerdo con el inóculo utilizado para iniciar el cultivo y con el crecimiento celular. La producción de AC se detectó desde el inicio de los cultivos, y en etapas consecutivas, se detectó en las muestras la aparición del ácido ferúlico y otro compuesto aún no identificado con tiempos de retención de 10 y 12 min respectivamente. Las

muestras correspondientes a la etapa final del crecimiento logarítmico mostraron las señales del compuesto ISO (Figura 22).

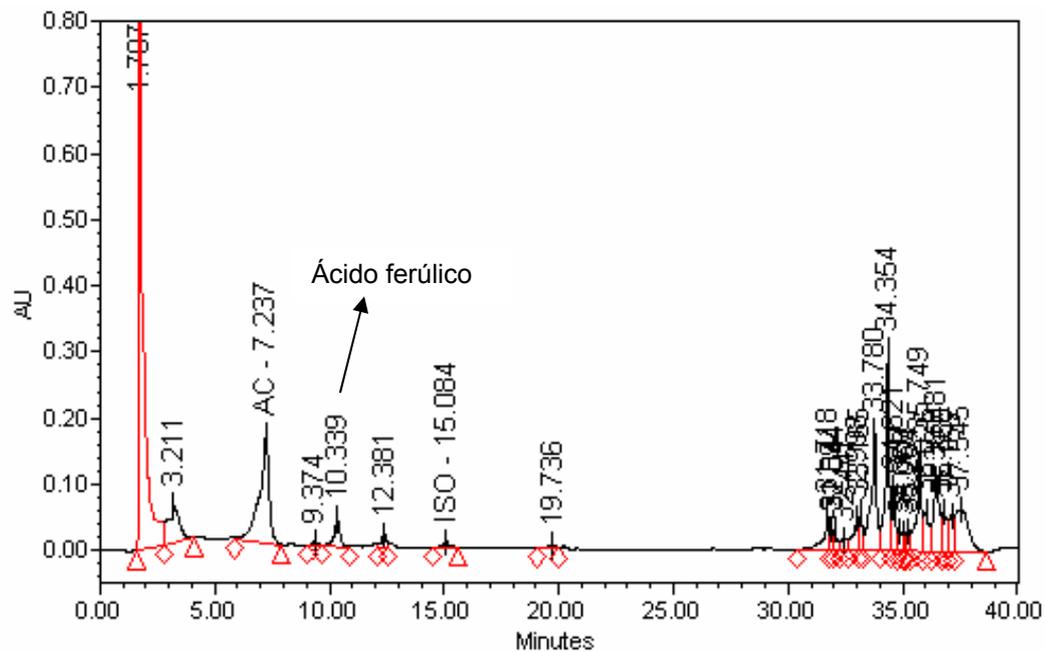


Figura 22. Perfil cromatográfico ( $\lambda = 254$  nm) del extracto metanólico del cultivo de células en suspensión de *C. obtusifolia*.

### 3.3.1. Efecto de la concentración del inóculo sobre la producción de AC e ISO en los cultivos celulares

En la cinética de crecimiento establecida, manejando un inóculo del 4% con respecto al peso fresco, el AC fue detectado en concentraciones de 0.57-1.94 mg/g de biomasa seca (BS) y no se detectó el compuesto ISO (Figura 23). En la fase de latencia, los niveles de AC fueron constantes, pero se incrementaron durante la fase de crecimiento logarítmico registrándose la más alta concentración a los 24 días de cultivo (15.94 mg/L). Posteriormente, la producción del compuesto fluctuó, mostrando el decremento más importante a los 33 días (biomasa máxima). Después de este tiempo, la acumulación de AC se volvió a incrementar, estabilizándose su producción durante la fase estacionaria (13.64 mg/L). En esta línea celular y bajo estas condiciones de cultivo, se puede

considerar al AC como un metabolito mixto, es decir, que su producción está parcialmente asociada al crecimiento (Quintero, 1990).

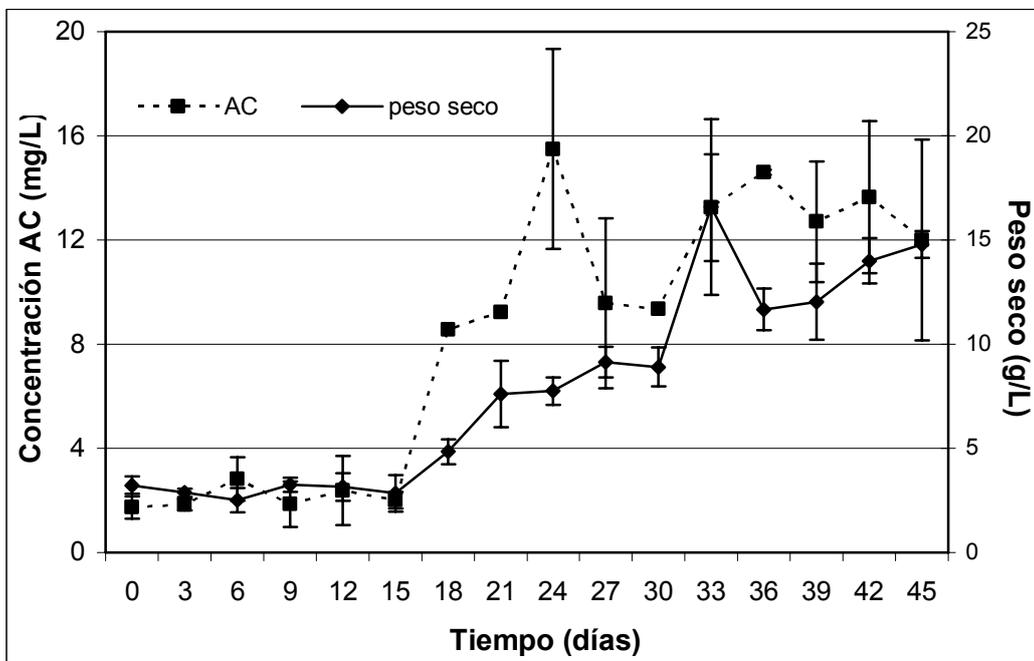


Figura 23. Cinéticas de crecimiento celular y acumulación de AC en los cultivos en suspensión de *C. obtusifolia* con un inóculo del 4%.

Con un inóculo del 5% con respecto al peso fresco (Figura 24), se detectó AC en niveles similares (0.53-1.50 mg/g de BS) a los anteriores detectados y su comportamiento también fue el de un metabolito mixto. Se detectó desde el inicio del cultivo, incrementando su producción durante la fase del crecimiento logarítmico, alcanzando la mayor producción (25.34 mg/L) a los 30 días de cultivo. Posteriormente, la producción disminuyó gradualmente durante la fase estacionaria (15.22 mg/L).

Por otra parte, la producción de ISO refleja la de un compuesto inducible de tipo fitoalexina. Este producto, en el medio de cultivo MS completo en contenido de sales, se presentó únicamente en la fase de crecimiento logarítmico (días 24 y 27) con niveles de  $1.03 \pm 0.03$  mg/L y 1.54 mg/L respectivamente.

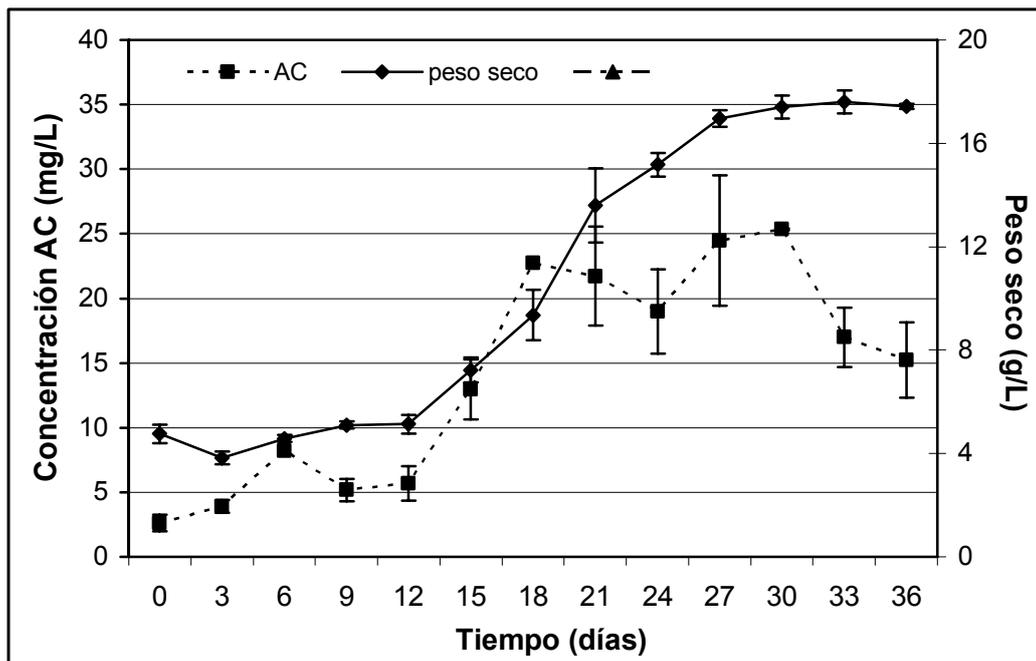


Figura 24. Cinéticas de crecimiento celular y acumulación de AC en los cultivos en suspensión de *C. obtusifolia* con un inóculo del 5%.

### 3.3.2. Efecto de la concentración de nitratos en la producción de AC e ISO en los cultivos celulares

La disminución del contenido de nitratos del medio en las suspensiones celulares, favoreció la acumulación de AC; mientras que, la producción de ISO sólo se mantuvo constante. La acumulación de AC con 16.0 mM de nitratos totales presentó una cinética de crecimiento similar a la determinada con el medio completo (27.4 mM); por el contrario, con 8.0 mM de nitratos, la producción mayor se registró a los 23 días de cultivo, posteriormente decayó (Figura 25). Las máximas concentraciones de AC obtenidas fueron significativamente diferentes ( $F_{0.05,2}=13.45$ ;  $p=0.0061$ ; Tukey  $_{0.05}=20.183$ ), siendo 10.25 mg/L la concentración en el medio MS completo, misma que se triplicó (31.57 mg/L) y cuadruplicó (43.98 mg/L) al reducir el contenido de los nitratos a 16.0 mM y 8.0 mM, respectivamente.

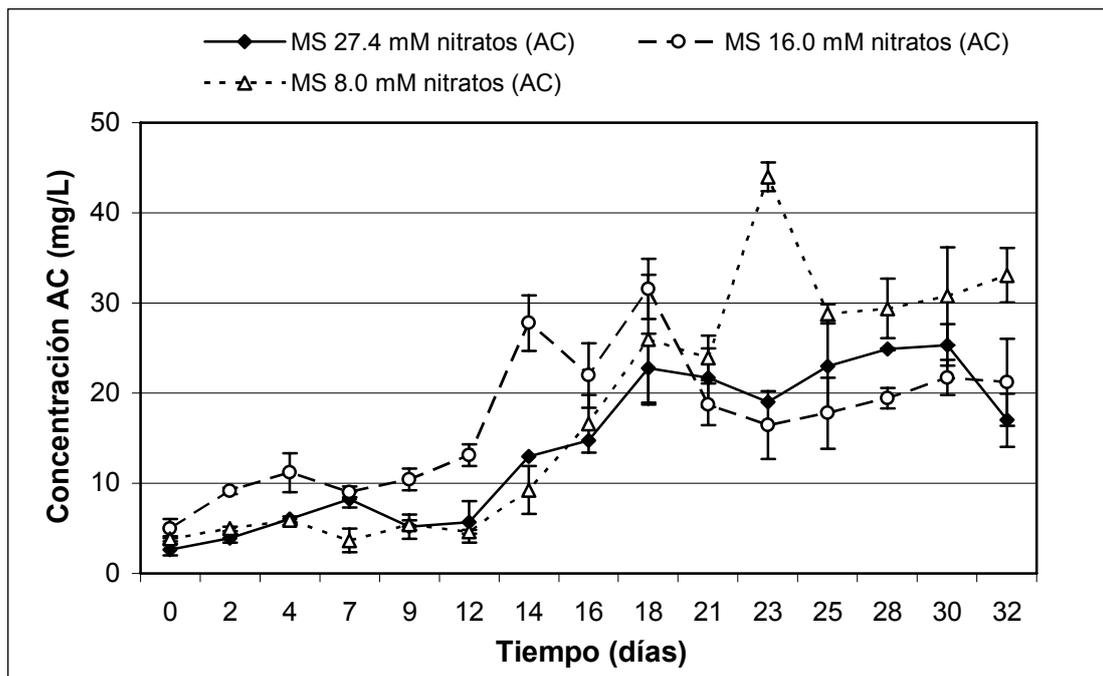


Figura 25. Cinéticas de producción del compuesto AC en cultivos celulares de *C. obtusifolia* con concentraciones variables de nitratos en el medio MS.

Con relación al compuesto ISO (Figura 26), su producción en el medio de cultivo completo se presentó únicamente durante el crecimiento logarítmico (días 25 y 28) con niveles de  $1.03 \pm 0.03$  mg/L y 1.54 mg/L respectivamente. Al igual que el AC, la disminución del contenido de nitratos a 16.0 y 8.0 mM favoreció su producción, se indujo la biosíntesis más temprana y por tiempo prolongado, a partir del día 14 hasta el final del cultivo. En la condición 16.0 mM se inhibió la producción de ISO en la fase estacionaria, incrementándose al final del cultivo; en tanto que, con la concentración 8.0 mM de nitratos, ISO se incrementó de manera sostenida hasta el término de la incubación. La máxima concentración del compuesto en el medio completo fue de 1.54 mg/L y de  $1.08 \pm 0.18$  y  $1.54 \pm 0.15$  mg/L al reducir la concentración de nitratos a 16.0 mM y 8.0 mM respectivamente (Figura 26). Estos resultados indican que ISO puede ser considerado un compuesto inducible, como una fitoalexina, que se produce principalmente en la fase estacionaria y en condiciones de estrés por deficiencia nutricional.

En un medio MS complementado con 8.0 mM de nitratos y a los 18 días de cultivo, la biomasa tuvo un contenido de 5 mg/g de AC, concentración mayor a la de hoja

de la planta silvestre (2.2 mg/g). Por otro lado, el contenido de ISO en la biomasa fue 10 veces menor (0.12 mg/g) al de la hoja (1.1 mg/g).

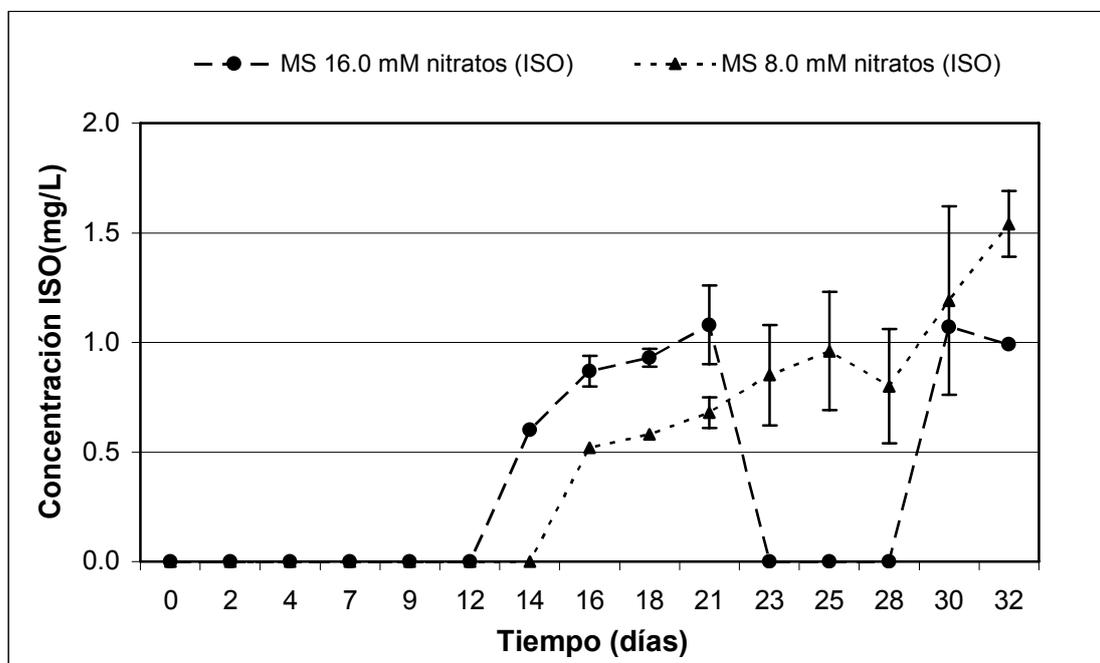


Figura 26. Cinéticas de producción del compuesto ISO en cultivos celulares de *C. obtusifolia* con concentraciones variables de nitratos en el medio MS.

### 3.4. Concentraciones de AC e ISO en las plantas de *C. obtusifolia*

El análisis por HPLC indicó que tanto la planta aclimatada al Estado de Morelos como las micropropagadas (Figura 27) conservaron la capacidad de producir los compuestos AC e ISO, así como un compuesto con espectro de absorción similar al de su aglicona, luteolina ( $t_r=17.0$  min). Por medio de un ANOVA simple se determinó una diferencia significativa entre las concentraciones de los compuestos en la planta silvestre, aclimatada y micropropagada ( $F_{0.05; 6, 1}=20.$ ,  $p<0.05$ ). Las concentraciones de ambos compuestos en la planta micropropagada de 6 meses de edad fueron similares a los de las plantas aclimatada y silvestre (Tukey  $q_{0.05} = 1.9824$ ) (Tabla 7). En la planta micropropagada de 2 meses de desarrollo se acumuló más ácido AC que ISO, pero en las otras etapas del desarrollo ambos compuestos se produjeron en concentraciones similares.

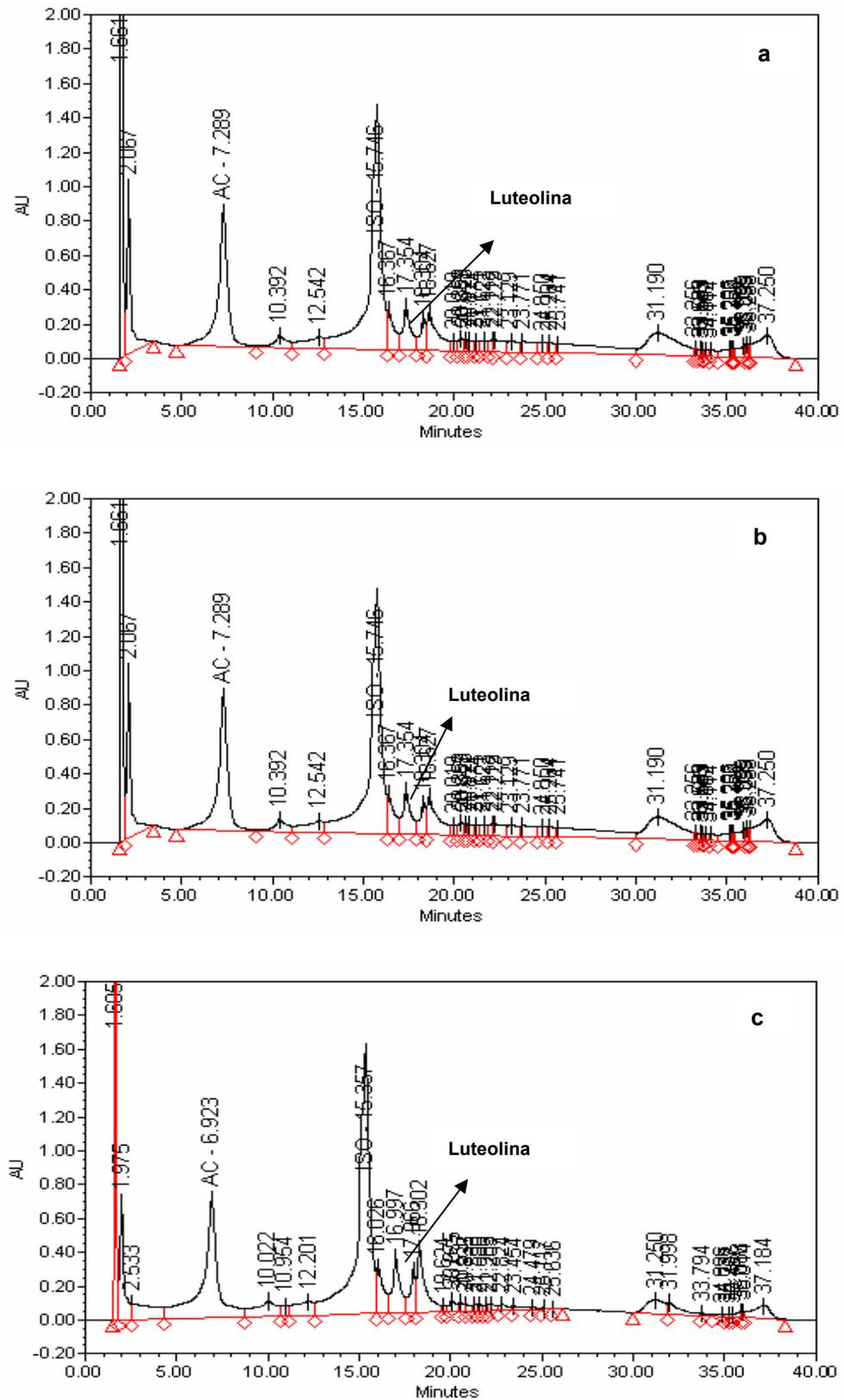


Figura 27. Perfil cromatográfico ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) de los extractos metanólicos de hojas de árboles y plantas de *C. obtusifolia*: silvestre (a), aclimatada (b) y micropropagada (c).

Tabla 7. Concentraciones de AC e ISO en los árboles y las plantas de *C. obtusifolia*.

Planta	Concentración (mg/g hoja)		
	AC	ISO	Total
<b>Silvestre</b>	2.21±0.13 (bc)	1.10±0.10 (bc)	3.31
<b>Aclimatada</b>	2.70±0.40 (ab)	2.11±0.10 (b)	4.81
<b>Micropropagada</b>			
1 mes	0.66±0.22 (c)	0.27±0.09 (c)	0.93
2 meses	3.6±0.89 (a)	1.17±0.21 (bc)	4.77
3 meses	0.73±0.43 (bc)	0.41±0.24 (bc)	1.14
6 meses	1.61±0.78 (bc)	1.30±0.58 (bc)	3.01

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukeyt  $q_{t, 0.05, 22}$ ; CA e ISO=1.9824).

## 4. Efecto hipoglucemiante de los productos

### 4.1. Actividad de los extractos de las plantas

Como se observa en la Figura 28, en comparación con el grupo control tratado con el vehículo, dosis de 0.5 g/kg de los extractos metanólicos de hojas de las plantas silvestre, aclimatada y micropropagada, disminuyeron en los animales normoglucémicos los niveles de la glucosa sérica con una diferencia significativa a las 2 y 4 horas ( $F_{0.05; 4, 105}=3.69$ ;  $p<0.05$ ). Asimismo, se determinó diferencia significativa entre las actividades determinadas a las 2 y 4 horas ( $F_{0.05; 2, 105}=15.12$ ;  $p<0.05$ ), siendo mayor el efecto a las 2 h de administrados los productos (<20%). Incrementando la dosis del extracto de la planta silvestre a 1 g/kg, el efecto hipoglucemiante a las 4h fue ligeramente más intenso (24%) que el producido por la glibenclamida a una dosis de 5 mg/kg (14%).

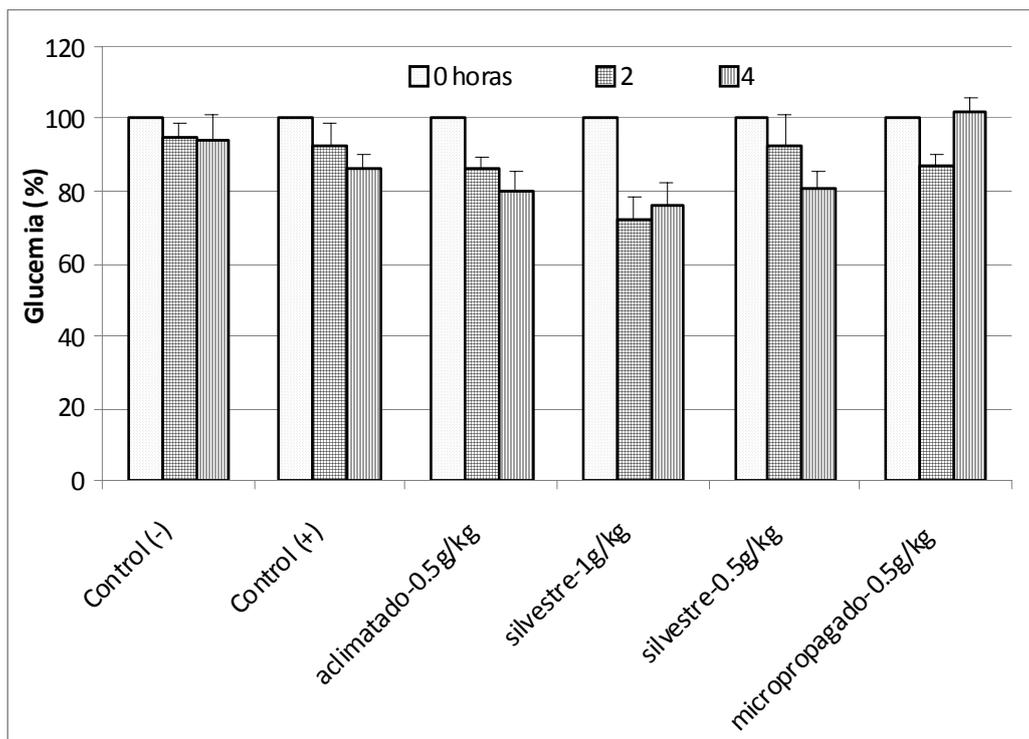


Figura 28. Efecto de los extractos de las plantas de *C.obtusifolia* sobre los niveles de glucosa sérica en ratones normoglucémicos.

#### 4.2. Actividad hipoglucemiante y contenido de AC e ISO en los extractos de las plantas de *C. obtusifolia*

La actividad hipoglucemiante de los extractos evaluados podría estar positivamente correlacionada con el contenido de AC e ISO. El mayor efecto (28 %) se registró a las 2 h tras la administración de 1 g/kg del extracto del árbol silvestre cuyo contenido de AC fue de  $25.6 \pm 1.5$  mg y de  $14.4 \pm 0.7$  mg de ISO ( $F_{0.05; 3, 8} = 196.028$ ;  $t_{0.05, 2} = 6.81$ ); con una dosis menor del extracto (0.5 g/kg) la actividad disminuyó a 7% (Tabla 8).

Sin embargo, comparando el contenido de AC en los extractos de las tres plantas administradas a una misma dosis, se observó que la intensidad del efecto hipoglucemiante a las 4 h de administrados los productos fue silvestre=aclimatada >micropropagada (AC=  $12.8 \pm 0.7$  mg;  $7.3 \pm 1.0$  mg;  $2.1 \pm 0.2$  mg) e (ISO=  $7.2 \pm 0.4$  mg;  $5.7 \pm 0.2$  mg;  $3.3 \pm 0.01$  mg) (Tabla 8).

Tabla 8. Contenido de AC e ISO y efecto hipoglucemiante de los extractos de las plantas *C. obtusifolia*.

Extracto de planta	AC (mg/dosis)	ISO (mg/dosis)	Hipoglucemia (%)	
			2 h	4 h
<b>Silvestre</b> (1 g/kg)	25.6±1.5	14.4±0.7	28	24
<b>Silvestre</b> (0.5 g/kg)	12.8±0.7	7.2±0.4	7	19
<b>Aclimatada</b> (0.5 g/kg)	7.3±1.0	5.7±0.2	14	20
<b>Micropropagada</b> (0.5 g/kg)	2.1±0.02	3.3±0.01	13	0

#### 4.3. Actividad de los extractos de células en suspensión

Dosis de 0.5 g/kg del extracto de las biomásas celulares cultivadas 18 días en medio MS con concentraciones variables de nitratos presentaron actividad hipoglucemiante a las 2 h de su administración (Figura 29, Tabla 9). Con respecto al grupo tratado con el vehículo, el extracto que presentó la mayor actividad fue el proveniente del medio de cultivo con 16.0 mM de nitratos (31.76%). Menor actividad mostraron los extractos de los cultivos tratados con 27.4 mM y 8.0 mM de nitratos (22.22% y 19.66% respectivamente), actividades que no fueron significativamente diferentes entre ellas (Tukeyt  $q_{t 0.05, 22} = 4.25$ ).

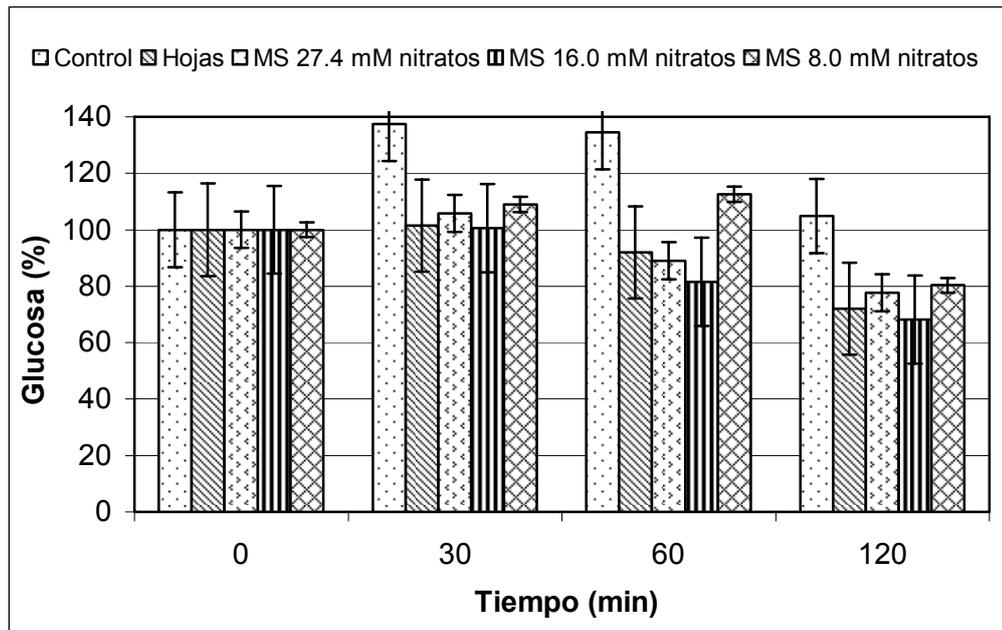


Figura 29. Efecto de los extractos de células en suspensión de *C. obtusifolia* en medio MS con concentraciones variables de nitratos sobre los niveles de glucosa sérica en ratones normoglucémicos

Tabla 9. Contenido de AC e ISO y efecto hipoglucemiante de extractos de células en suspensión de *C. obtusifolia* en medio MS con concentraciones variables de nitratos.

Tratamiento	Hipoglucemia (%)	AC (mg/dosis)	ISO (mg/dosis)
Control	4.84	0	0
<b>Células en suspensión</b>			
27.4 mM nitratos	22.22 b	4.08	0
16.0 mM nitratos	31.76 a	7.90	0.19
8.0 mM nitratos	19.66 b	5.04	0.07

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de separación de medias Tukeyt  $q_{t0.05, 22} = 4.25$ .

## VIII. DISCUSIÓN

Los productos naturales, entre ellos los vegetales, son una fuente inagotable de metabolitos secundarios, moléculas activas que pueden tener aplicación con fines terapéuticos. En la búsqueda de nuevos fármacos, estas moléculas son novedosas estructuras que pueden ser utilizadas en su forma original o como prototipos para la síntesis de derivados de gran especificidad y con menores efectos secundarios. Sin embargo, aquellas plantas que son utilizadas en las medicinas tradicionales tienen en la actualidad fuerte impacto en la sociedad y la complejidad de sus constituyentes, así como la acción que ejercen sus extractos sobre diversos blancos terapéuticos son de interés tanto para la industria farmacéutica como para la comunidad científica.

México goza de una flora medicinal que es extensa, diversa y cuyas propiedades medicinales son del conocimiento ancestral de sus pobladores. Apoyándose en los conocimientos etnobotánicos y científicos de las plantas, actualmente se continúa en la búsqueda de nuevos fármacos y se ha generado un campo de investigación multidisciplinario involucrando estudios etnobotánicos, fitoquímicos, farmacológicos y biotecnológicos.

La investigación científica de la herbolaria medicinal de México ha propiciado el desarrollo de algunos fitomedicamentos y con estos propósitos se ha abordado el estudio de una de las especies medicinales de amplio uso en el país como remedio para el control de la diabetes mellitus, *Cecropia obtusifolia*. En su gran mayoría, las plantas medicinales en México no son cultivadas; por ello, la biotecnología es una herramienta valiosa que viene a contribuir a resolver el problema para la obtención de un material vegetal controlado y en gran escala. Los resultados en el presente estudio son una aportación a la investigación de la planta y establecen las condiciones necesarias para la producción del vegetal (Figura 16), así como de los cultivos de células en suspensión con un alto contenido de los dos principales compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante, el AC y la ISO (Figuras 25 y 26).

En el proceso de calogénesis con explantes de hoja de la especie *C. obtusifolia* colectada en el Edo. de Tabasco y aclimatada al Edo. de Morelos, se demostró que los tratamientos con los fitoreguladores ANA y 2,4-D a una concentración de 2 mg/L (8.92  $\mu$ M) en el medio generan la mayor producción de biomasa (Figura 12); estos fitoreguladores son los más ampliamente utilizados en procesos de calogénesis. Asimismo, la concentración de las auxinas también fueron óptimas para la calogénesis

(Figura 14) con explantes de hoja, hipocótilo y cotiledón de plántulas obtenidas a partir de la germinación *in vitro* de las semillas. Por el contrario, el tallo expuesto a ANA generó brotes (Figura 14), situación que es predecible dada la presencia de tejido meristemático en este tipo de órganos, aunque las concentraciones de los fitoreguladores presentes en el medio MS (8.92  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 2.22  $\mu\text{M}$  de BAP) no son las óptimas (8.92  $\mu\text{M}$  de BAP) para inducir brotación (Rout y col., 2000; Nalawade e His-Sheng 2004).

En la literatura científica, la germinación de las semillas de *C. obtusifolia* obtenidas directamente del árbol silvestre reporta un valor de 85-90%. Después de 7 días que éstas han caído al suelo, únicamente la mitad de ellas han sido viables y el porcentaje de germinación baja hasta 20-40%. El bajo porcentaje de germinación (20%) observado en el presente estudio con las semillas de *C. obtusifolia* se atribuye fundamentalmente al tiempo que transcurrió entre la colecta realizada en la zona de Tabasco y el manejo *in vitro* de las mismas en las condiciones establecidas. Es importante señalar que las semillas son recalcitrantes y los embriones tienen un período de vida corto (La Pierre, 2001; Conabio, 2008).

La elongación y el enraizamiento *in vitro* de los brotes fue un proceso espontáneo que se dio en el medio libre de reguladores y la posterior aclimatización de las plántulas en condiciones de invernadero y campo fue exitosa (Figura 15). Está ampliamente descrito que el éxito de un protocolo de cultivo de tejidos dependerá de la eficiencia con la que se logren aclimatizar las plántulas obtenidas *in vitro* (Nalawade y Tsay, 2004). Al respecto, varios autores han mencionado que los problemas de aclimatización mantienen una estrecha relación con la calidad de la raíz, sobre todo cuando el desarrollo de la plántula se ha llevado a cabo en un medio de cultivo gelificado con agar y pasa luego a un manejo *ex vitro* perdiendo funcionalidad (Yu y col., 2000).

Con respecto a la velocidad de crecimiento mensual que registraron las plantas micropropagadas (Tabla 2), éste es un parámetro que fue superior al reportado para las especies silvestres, efecto que podría ser atribuido a que al producirse *in vitro* conservaron cierta concentración de los reguladores de crecimiento (Conabio, 2008). En condiciones de invernadero, las hojas de las plantas fueron lanceoladas y la lobulación se inició a los 3 meses de su adaptación; sin embargo, al exponer las plantas a las condiciones del medio ambiente, el 95% de ellas desarrollaron hojas lobuladas, fenómeno que es característico en los árboles silvestres (Conabio, 2008). Por otra parte, después de 6 meses de desarrollo en las condiciones ambientales, se observó que el diámetro del tallo y el número de las hojas se había duplicado; el incremento en el

diámetro (2 cm por año) del tallo fue similar al de los árboles silvestres de *C. obtusifolia* (Conabio, 2008).

A lo largo de 6 meses de crecimiento, la concentración de los constituyentes en los extractos metanólicos de las hojas de las plantas aclimatada y micropropagada no fueron significativamente diferentes a los del árbol silvestre y se detectaron en todas las muestras señales de AC e ISO (Figura 27). Si bien, en la planta micropropagada de 2 meses de desarrollo se detectó mayor concentración del ácido AC que ISO (Tabla 7), ambos fenoles se sintetizaron luego en concentraciones similares, pero significativamente menores a las registradas a los 2 meses de edad. Las diferencias observadas son coherentes ya que la planta joven es más vulnerable al ataque microbiano y produce concentraciones mayores de los compuestos de defensa que el árbol adulto (Goralka y Langenheim, 1996; Nugroho y y Verporte, 2002; Shudha y Ravinshanka, 2002). Además, estas diferencias podrían estar relacionadas con factores ecológicos y ambientales (temperatura, humedad, altitud, suelo y microflora) de las localidades donde las plantas aclimatada, aclimatizadas (Xochitepec, Morelos; 1109 msnm) y el árbol silvestre crecen (Cunduacán, Tabasco; 40 msnm), así como a la disponibilidad de nutrientes y periodo de colecta de las hojas (Charlwood y Rhodes, 1990; Goralka y Langenheim, 1996; Nugroho y y Verporte, 2002; Shudha y Ravinshanka, 2002). Sin embargo, se ha reportado un aumento en el contenido de AC con el incremento de la edad, bajo estrés por minerales, sequía y carencia de nitrógeno en plantas de *Heliantus annuus* (Adams y Price, 1978).

En el estudio presente, a lo largo del desarrollo mensual de las plantas aclimatada y micropropagada, los niveles de AC en los extractos metanólicos de las hojas fueron similares a los determinados en estudios anteriores en la especie silvestre (0.22-2.99 mg/g) (Herrera y col., 2004; Nicasio y col., 2005); sin embargo, el compuesto ISO es cuantificado por primera vez en la especie. Cabe mencionar que el contenido de los compuestos AC en la planta silvestre fue ligeramente menor al reportado para la especie colectada en Veracruz (Nicasio y col., 2005).

La potencia del efecto hipoglucemiante de las plantas evaluadas en el modelo animal de experimentación muestra que la planta aclimatada reproduce la actividad biológica del árbol silvestre, alcanzando un valor máximo del 20% a las 4 h de administrada la dosis de 0.5 g/kg de extracto (Tabla 8); a este tiempo, la especie micropropagada no presentó actividad. Con base en los estudios anteriores que atribuyen el efecto hipoglucemiante de *C. obtusifolia* silvestre a la presencia de AC en el extracto metanólico (Andrade-Cetto y col., 2001; Nicasio y col., 2005) y de ISO (Andrade-Cetto y

col., 2001), cabe señalar que el contenido de AC en los extractos de la especie micropropagada fue de 2.1 mg/0.5 g y de 7.3 mg/0.5 g en la planta aclimatada, dosis significativamente menores a la de la planta silvestre (12.8 mg/0.5 g). A su vez, la concentración del compuesto ISO en los extractos de las plantas micropropagada, adaptada y silvestre fue de 3.3 mg/0.5 g, de 5.7 mg/0.5 g y de 7.2 mg/0.5 g respectivamente; resultados que permiten asumir que la actividad hipoglucemiante depende de la dosis de los productos a administrar, y probablemente, a la presencia de otros compuestos.

En base a las características de friabilidad que presentaron los callos derivados de explants de hoja de la planta aclimatada, el cultivo en suspensión se estableció con 2 mg/L (8.92  $\mu$ M) de 2,4-D (Figura 17) y las cinéticas mostraron que el tiempo de duplicación, la velocidad específica y el índice de crecimiento (Tabla 3), están dentro de los parámetros reportados para los vegetales (Payne y col., 1992; Villarreal y col., 1997; Kieran y col., 1997).

Independientemente de las auxinas utilizadas como fitoreguladores, las líneas celulares de callo mostraron sólo la presencia del compuesto AC en concentraciones similares (Tablas 5 y 6); por el contrario, en el cultivo en suspensión (Figuras 23 y 24), AC se detectó durante todo su desarrollo (constitutivo) mientras que ISO se detectó solamente al final del crecimiento logarítmico, lo que indicaría que es un producto no asociado al crecimiento, metabolito secundario (Wang y col., 2003). Los niveles de AC e ISO detectados en los cultivos celulares fueron similares a los detectados en las hojas de la especie silvestre. Se ha reportado que los cultivos de células en suspensión de *Eucommia ulmoides* establecidas con 2,4-D, acumulan AC ( $2.15 \pm 60.09$ ) en niveles similares a los detectados en las hojas ( $2.56 \pm 60.06$ ) de la planta (Wang y col., 2003).

Basados en la hipótesis sobre el balance del nutriente carbono y nitrógeno en las plantas propuesta por Fritz y col. (2006), la disminución de la concentración de los nitratos en el medio de cultivo estimularía la producción de metabolitos de tipo fenólico. Un antecedente importante a señalar en este trabajo es que en los cultivos de células en suspensión tipo lote en concentraciones variables de nitratos en el medio (16.0, 27.4 mM) no afectaron el desarrollo máximo de la biomasa celular (Figura 19 y Tabla 14); sin embargo, aunque la biomasa celular se redujo con concentraciones de 8.0 mM de nitratos totales, la producción de AC se cuadruplicó (Figura 26). Por otra parte, la reducción de los nitratos a una concentración de 8.0 mM no incrementó la síntesis de ISO (Figura 17); no obstante, mantuvo su producción hasta la fase estacionaria, indicando con

ello la producción de un metabolito secundario inducible de tipo fitoalexina (McNally y col., 2003).

La luz es otro factor que ya se ha contemplado como importante para el establecimiento y desarrollo de las suspensiones celulares y la producción de AC (Guillet y col., 1999). Por ejemplo, en la especie *C. peltata* se ha reportado que la mejor condición en medio MS complementado con la auxina 2,4-D es mantener un fotoperíodo de 8 h luz (Ríos, 2007). En iguales condiciones a las reportadas, la biomasa máxima obtenida en los cultivos en suspensión de *C. obtusifolia* fue mayor a la obtenida con *C. peltata*, aunque la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación fueron similares. A diferencia de lo observado con los cultivos celulares de *C. obtusifolia*, la biomasa máxima de *C. peltata* se incrementó al disminuir a la mitad el contenido de nitratos en el medio (Ríos, 2007). La inducción de compuestos fenólicos por medio de la reducción de los nitratos en las suspensiones celulares se ha logrado con éxito para varias especies medicinales; tal es el caso de la capsaicina en *Capsicum frutescens* (Ramachandra-Rao y Ravishankarb, 2002), antraquinonas en *Morinda citrifolia* (Farzami-Shepher y Ghorbanli, 2002) y antocianinas en especies de *Vitis* (Ramachandra-Rao y Ravishankarb, 2002).

En comparación con el extracto metanólico de la planta silvestre, la evaluación del efecto hipoglucemiante de 0.5 g/kg vía oral de los extractos metanólicos obtenidos del cultivo en suspensión a los 18 días (fase final del crecimiento logarítmico) y con los tratamientos correspondientes a 8.0 mM, 16.0 mM y 27.4 mM de nitrato total en el medio MS (Figura 29 y Tabla 9), mostró en los tres casos, una disminución significativa de los niveles séricos de glucosa a las 2 h siguientes a la administración de los productos. La mayor actividad se observó con el extracto de la suspensión celular desarrollada en el medio con 16.0 mM de nitratos con un valor de 31.8% efecto significativamente superior al demostrado con el extracto de la planta silvestre (7%). Considerando que la composición del extracto de la planta silvestre es más complejo que la del cultivo en suspensión, la interacción entre los compuesto puede estar alterando el efecto biológico.

## IX. CONCLUSIONES

1. La planta silvestre colectada en Tabasco, se aclimató exitosamente a las condiciones climáticas del Edo. de Morelos.
2. El proceso de desinfestación de las hojas de la planta adaptada permitió obtener un cultivo aséptico en condiciones *in vitro*. Los diferentes explantes respondieron al proceso de desdiferenciación estableciéndose líneas celulares friables. El mejor tratamiento para obtener las líneas celulares fueron las auxinas ANA y 2,4-D en concentración de 8.92  $\mu\text{M}$  en combinación con 2.22  $\mu\text{M}$  de BAP.
3. Al no preservarse las condiciones óptimas para la viabilidad del embrión cigótico (luz, temperatura y humedad), el porcentaje de germinación de las semillas secas de la planta silvestre fue bajo (<20%). De las semillas germinadas se obtuvieron plántulas cuyos explantes de hoja, tallo, hipocótilo y cotiledón desarrollaron callos rizogénicos con la auxina 2,4-D. Cuando los explantes fueron expuestos a ANA, la hoja formó callo, cotiledón e hipocótilo desarrollaron raíces adventicias y el tallo generó callo o callo con brotes.
4. Los brotes se separaron, elongaron y enraizaron en medio MS libre de fitoreguladores de modo que las plántulas generadas fueron aclimatizadas en condiciones de invernadero y de campo para obtener las plantas micropropagadas que se analizaron en el presente estudio.
5. Las plantas micropropagadas conservaron las características morfológicas de la especie silvestre y sintetizaron los compuestos AC e ISO, así como la aglicona de ISO, luteolina.
6. La concentración de los metabolitos secundarios AC e ISO en las plantas micropropagada varió según la edad del vegetal.
7. Todas las líneas celulares mostraron producción de AC en concentraciones similares, así como ácido ferúlico, uno de los precursores del fenilpropanoide; ninguna produjo ISO.
8. A partir de una línea celular se inició el cultivo de células en suspensión empleando un inóculo de 5% que mostró la cinética de crecimiento típica de los

vegetales indicando con ello que se diseñaron las condiciones óptimas para su mantenimiento en cultivo tipo lote.

9. El cultivo de células en suspensión presentó células libres con pocos agregados de tamaño pequeño. Desde el inicio del cultivo se detectó la producción de AC y al inicio de la fase estacionaria se sintetizó el compuesto ISO.
10. En el cultivo de células en suspensión, la síntesis de AC mantuvo una estrecha relación con el crecimiento celular mostrando con ello que AC es un metabolito constitutivo. Por el contrario, la síntesis de ISO se indujo sólo en la fase estacionaria indicando que el compuesto es un metabolito secundario inducible de tipo fitoalexina.
11. La restricción de nitratos en el medio de cultivo no modificó el crecimiento celular, pero estimuló significativamente la síntesis del AC. En el caso del ISO, la disminución de la concentración de nitratos en el medio no modificó la concentración del compuesto, pero mantuvo su producción a lo largo de toda la fase estacionaria. La disminución de nitratos favoreció la producción de ambos compuestos.
12. El efecto hipoglucemiante de los productos analizados indica que la mayor actividad se logró con la suspensión celular cultivada en un medio complementado con 16.0 mM de nitratos en el que hay producción de los metabolitos AC e ISO, compuestos cuya actividad hipoglucemiante ha sido anteriormente demostrada.
13. Dado que no existe en la literatura científica reportes sobre el establecimiento de cultivos *in vitro* de la especie *Cecropia obtusifolia*, el presente trabajo es una aportación para la obtención del material vegetal que se propone como agente terapéutico.

## **X. PERSPECTIVAS**

Como perspectivas futuras en el estudio de *C. obtusifolia* se propone ampliar el espectro de las observaciones para la obtención de un cultivo que incremente la concentración de los metabolitos secundarios responsables de la actividad hipoglucemiante, a un nivel notablemente superior al de la planta silvestre.

- ❖ Establecer los niveles de nitratos necesarios para una mayor producción de los compuestos hipoglucemiantes AC e ISO
  
- ❖ Utilizar metales (cobre y hierro), celulasa o metiljasmonato como estrategia de estimulación para incrementar la producción de los compuestos fenólicos.
  
- ❖ Evaluación química y farmacológica de los compuestos fenólicos aún no identificados en los cultivos de callos y células en suspensión.
  
- ❖ Escalamiento del cultivo de células en suspensión.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams R, Price S. Seasonal variation in resource allocation of extractable compounds in *Asclepias*, *Chrysothamnus* and *Grindelia*. *Biochemical, Systematic and Ecology*, 1978; 15: 417-426.

Aguilar L. Evaluación de la Actividad Hipoglucemiante de los Extractos de *Cecropia obtusifolia* Bertol. Tesis de Postgrado, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F., 2004; 92 pág.

Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, DF; 1994; 142.

Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME. Plantas Medicinales del Herbario del IMSS, su distribución por enfermedades. Instituto Mexicano del Seguro Social y Grupo Roche Syntex de México, México, DF; 1998; 40.

Alarcón-Aguilar FJ, Román-Ramos R, Flores-Saenz JL, Aguirre-García F. Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytotherapy Research*, 2002; 16: 383-386.

American Diabetes Association. Standards of medical care in Diabetes-2008. *Diabetes Care*, 2008; 31(1): 12-54.

Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001; 78: 145-149.

Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005; 99: 325-348.

Andrade-Cetto A, Becerra-Jiménez J, Cárdenas-Vázquez R,  $\alpha$ -glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008; 116: 27-32.

Argueta A, Cano L, Asselein L, Rodarte ME. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo II. México, D.F. Instituto Nacional Indigenista (INI). 1994; 706-707.

Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites; a historical perspective. *Plant Science*, 2001; 161: 839-581.

Brunneton J. Pharmacognosy. Phytochemistry, Medicinal Plants. Lavoisier Publishing, 2<sup>a</sup> ed., París Francia, 1999; 227-334.

Charlwood BV, Rhodes MJ. Secondary Products from Plant Tissue Culture. Oxford University Press. N. Y. E. U. A. 1990; 228 pág.

Chehade JM y Mooradian AD. A Rational Approach to Drug Therapy of Type 2 Diabetes Mellitus. *Disease Managemet*, 2000; 60 (1): 95-113.

Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, 2008. Web page:[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/49-morac3m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/49-morac3m.pdf) (acceso: enero, 2008).

Debergh PC, Zimmerman RH. Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, 2<sup>a</sup> ed, México D.F., 1993; 488 pág.

Dornenburg H, Knorr D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995; 17: 674-684.

Farzami-Shepher M, Ghorbanli. Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinones in callus cultures of *Rheum ribes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002; 68: 171-175.

Fratti Munari AC, Vera Lastra O, Ariza Andraca CR. Evaluation of nopal capsules in diabetes mellitus. *Gaceta Médica de México*, 1992; 128: 431-6.

Fritz C, Palacios N, Fiel R, Stitt M. Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, 2006; 46: 533–548.

Gamborg OL, Phillips GC. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Fundamental Methods)*. Springer-Verlang, Berlin Heidelberg, 1995; 45-90.

Gómez-Kosky R. Cultivo de células y tejidos. En: Pérez-Ponce JN. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara; 1998; 25-44.

Goralka R, Langenheim J. Implications of foliar monoterpenoid variation among ontogenic stages of the California bay tree (*Umbellularia californica*) for deer herbivory. *Biochemical Systematic and Ecology*, 1996; 24: 13-23.

Guillet F, Mesnard F, Fliniaux O, Monti J, Flineaux M. Chlorogenic acid in a *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999; 37: 869-875.

Gupta MP. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. CYDET-SECAB, Bogotá; 1995; 405-406.

Gupta A, Gupta R, Lal B. Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: a double blind placebo controlled study. *Journal of Association of Physicians India*, 2001; 49: 1057-1061.

Gutiérrez Domínguez MA, Betancourt Aguilar Y. El Mercado de Plantas Medicinales en México: situación actual y perspectivas de desarrollo. Web page: [www.geocities.com/redmexicana/colombia.doc](http://www.geocities.com/redmexicana/colombia.doc) (accessed, July 2008).

Güven S, Kuenzi J. Diabetes mellitus In: Porth Mattson C. *Pathophysiology, Concepts of Altered Health-states*. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia y Nueva York, 5<sup>a</sup> ed., 1998; 36: 805-830.

Hernández Galicia E, Aguilar Contreras A, Aguilar Santamaría L, Román Ramos R, Chávez Miranda AA, García Vega LM, Flores Saenz JL, Alarcón Aguilar FJ. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proceeding of the Western Pharmacology Society*, 2002; 45: 118-124.

Herrera-Arellano A, Aguilar-Santamaría L, García Hernández B, Nicasio-Torres P, Tortoriello J. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*, 2004; 11: 561-566.

International Diabetes Federation. Web page: <http://www.idf.org> (acceso: mayo, 2008).

Instituto Nacional de Biodiversidad, 2008. Web page: <http://darnis.inbio.ac.cr/ubis/FMPro?-DB=UBIPUB.fp3&-lay=WebAll&-error=norec.html&-Format=detail.html&-Op=eq&id=1322&-Find> (acceso: enero, 2008).

Jhonston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003; 78: 728-733.

Kieran MP, MacLoughlin PF, Malone DM. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 1997; 59: 39-52.

Kimmel B y Inzucchi SE. Oral Agents for Type 2 Diabetes: An Update. *Clinical Diabetes*, 2005; 23(2): 64-76.

Kwon YI, Apostolidis E., Shetty K. *In vitro* studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*, 2008; 99(8): 2981-2988.

Lacaille-Dubois MA, Franck U, Wagner H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 2001; 8 (1): 47-52.

LaPierre LM. Vegetative propagation of *Cecropia obtusifolia* (*Cecropiaceae*). *Revista de Biología Tropical*, 2001; (3-4): 1-4.

Ludvik B, Neuffer B, Pacini G. Efficacy of *Ipomoea batatas* (Caiapo) on diabetes control in type 2 diabetic subjects treated with diet. *Diabetes Care*, 2004; 27: 436-40.

Lyon G. Metabolic Pathways of the Diseased Potato, Scottish Crop Institute. Invergowrie Dundee Scotland. Web page: <http://www.drastic.org.uk> (acceso: enero, 2008).

Marja K, Caldentery O, Inzé D. Plant cell factories in the post genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 2004; 9: 433-440.

Martínez M. Las Plantas Medicinales de México. Botas 5° ed., México, DF; 1969; 151-153.

Mattson P.C. Diabetes mellitus en: Pathophysiology Concepts of Altered Health States, 5ª Edicion, Lippincott, Philadelphia New York; 1998; 805-830.

McCarty MF. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Medical Hypotheses*, 2005; 64: 848-853.

McNally DJ, Wurms KV, Labbé C, Quideau S, Bélanger RR. Complex C-glycosyl flavonoid phytoalexins from *Cucumis sativus*. *Journal Natural Products*, 2003; 66: 1280-1283.

Mellado V, Lozoya-Meckes M. Effect of the aqueous extract of *Cecropia obtusifolia* on the blood sugar of normal and pancreatectomized dogs. *International Journal of Crude Drug Research*, 1984; 22: 11-16.

Mithöfer A, Schulze B, Boland W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2004; 566: 1-5.

Murashige T y Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*, 1962; 15: 473-497.

Mühlbac HP. Use of plant cell cultures in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, 1998; 4: pág. 113 Y176.

Nalawade SM y Tsay HS. *In vitro* propagation of some important Chinese medicinal plants and their sustainable usage. *In vitro Cell and Development Biology-Plant*, 2004; 40: 143-454.

Nath Tiwari K, Chandra Sharma N, Tiwari V, Deo Sing B. Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal herb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001; 63: 179-185.

NCSS, Number Cruncher Statistical Software (Wireframe Graphics). Kaysville, Utah, USA, 2001.

Neves LO, Tomas L, Fevereiro MPS. Micropropagation of *Medicago truncatula* Gaertn. Cv. Jemalong and *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001; 67: 81-84.

Nicasio P, Aguilar-Santamaría L, Aranda E, Ortiz S, González M. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. *Phytotherapy Research*, 2005; 19: 661-664.

Nugroho LH y Verporte R. Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002; 68: 105-125.

Payne GF, Bringi V, Prince CL, Shuler ML. Suspension cultures in: *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Ed. John Wiley and Sons, New York, 1992; 159-162.

Paz NJ, Corral SA, Jiménez RG, Fernández MM, Pérez SP. Efecto hipoglucemiante del extracto fluido de *Tecoma stans* en roedores. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 2003; 32: 13-17.

Pérez RM, Ocegueda A, Muñoz JL, Avila JG, Morrow WW. A study of the hypoglycemic effect of some Mexican plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 1984; 12: 253-262.

Pérez–Guerrero C, Herrera MD, Ortíz R, Álvarez de Sotomayor M, Fernández MA. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001; 76: 279-284.

Quintero R. Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones. Editorial Alhambra Mexicana, México D.F., 1990; 332 pág.

Ramachandra-Rao S. y Ravishankar G. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 2002; 20: 101-153.

Revilla MC, Andrade-Cetto A, Islas S, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002; 81: 117-120.

Revilla-Monsalve MC, Andrade-Cetto A, Palomino-Garibay MA, Wiedenfeld H, Islas-Andrade S. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007; 111: 636-640.

Ríos Cortés AM. Establecimiento de Cultivos de Células en Suspensión de *Cecropia peltata*, Productores de Compuestos Hipoglucemiantes. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2007; 85 pp.

Rodríguez de Sotillo DV, Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002; 13: 717-726.

Román-Ramos R, Flores-Saenz JL, Partida-Hernández G, Lara-Lemus A, Alarcón-Aguilar F. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica* (México), 1991; 22: 87-93.

Román-Ramos R, Lara Lemus A, Alarcón-Aguilar F, Flores-Saenz JL. Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica* (México), 1992; 23 (3): 105-109.

Ross SA, Gulve EA, Wang M, Chemistry and Biochemistry of Type 2 Diabetes. *Chemical Review*, 2004; 104: 1255-1282.

Rout GR, Samantaray S, Das P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 2000; 18: 91-120.

Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Web page: [http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/cecropia\\_obtusifolia.htm](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/cecropia_obtusifolia.htm) (acceso: enero, 2008).

Sezik E, Aslan M, Yesilada E, Ito S. Hypoglycaemic activity of *Gentiana oliveri* and isolation of the active constituent through bioassay- directed fractionation techniques. *Life Sciences*, 2005; 76: 1223-1238.

Stafford AM. Plant cell cultures as a source of bioactive small molecules. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2002; 5: 296-303.

Shudha G y Ravishanka G A. Involvement and interaction of various signalling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002; 71: 181-212.

Upadhyay UM, Goyal RK. Efficacy of *Enicostemma littorale* in Type 2 diabetic patients. *Phytotherapy Research*, 2004; 18: 233-235.

Tuomilehto J, Lindström J, Ericsson JG, Valle TT, Hamalaninen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uustipa M. Prevention of Type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *The New England Journal of Medicine*, 2001; 344: 1343-50.

Vázquez-Martínez JL, Gómez-Dantés H, Fernández-Cantón S. Diabetes mellitus en población adulta del IMSS. Resultados de la encuesta Nacional de salud 2000. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 2006; 44: 13-26.

Villarreal ML, Arias C, Vega J, Feria-Velasco A, Ramírez OT, Nicasio P, Rojas G, Quintero R. Large-scale cultivation of *Solanum chrysotrichum* cells: Production of the antifungal saponin SC-1 in 10-l airlift bioreactors. *Plant Cell Reports*, 1997; 16, 653-656.

Wang J, Liao X, Zhang H, Du J, Chen P. Accumulation of chlorogenic acid in cell suspension cultures of *Eucommia ulmoides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003; 74: 193-195.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projection for 2030. *Diabetes Care*, 2004; 27: 1047-1051.

World Health Organization. Web page: <http://www.who.org> (acceso: enero, 2008).

Yu TA, Yeh SD, Cheng YH, Yang JS. Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2000; 61: 29-35.

México D.F. a 27 de julio del 2009

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Producción de compuestos hipoglucemiantes en cultivos de células en suspensión de  
*Cecropia obtusifolia* (Bertol) “guarumbo”**

que presentó

M. en B. María del Pilar Nicasio Torres

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesor: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Asesor: Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez

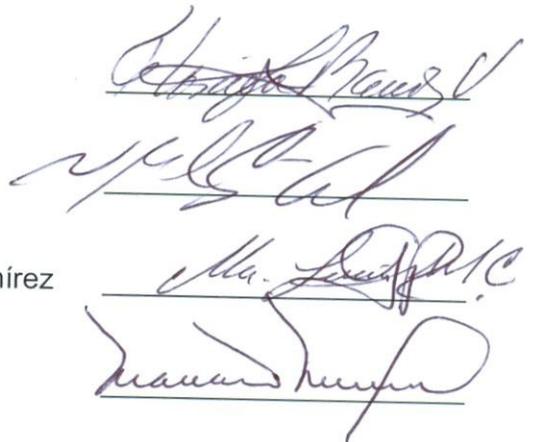
**Jurado:**

Presidente: Dra. Florina Ramírez Vives

Secretario: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Vocal: Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez

Vocal: Dra. Mariana Meckes Fischer



The image shows four handwritten signatures, each written over a horizontal line. From top to bottom, the signatures correspond to the jury members listed in the text: Florina Ramírez Vives, Víctor Manuel Chávez Ávila, María Luisa del Carmen Garduño Ramírez, and Mariana Meckes Fischer. The signatures are in black ink and are somewhat stylized.