

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Producción de compuestos activos en suspensiones celulares de *Tilia americana* var. *mexicana*, por estimulación abiótica empleando el modelo de superficie de respuesta

TESIS

para obtener el grado de

Doctor en Biotecnología

PRESENTA

M. en B. Daniel Cisneros Torres

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Cruz Sosa', written over the name of the director.

Co-Director: Dra. María del Pilar Nicasio Torres

Asesor: Dr. Manasés González Cortázar

Iztapalapa, Ciudad de México, junio de 2020



El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo

El M. en B. Daniel Cisneros Torres recibió la beca CONACyT con el número de registro 302000 y apoyo complementario como becario de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social con matrícula 99187269

El protocolo de tesis se registro en el Comité Local de Investigación (CLIS 1702) con número R-2016-1702-55 y contó con financiamiento del Centro de Investigación Biomédica del Sur Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIS-IMSS)

México D.F. a 8 de junio del 2020

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

Producción de compuestos activos en suspensiones celulares de *Tilia americana*
var. *mexicana*, por estimulación abiótica empleando el modelo de superficie de
respuesta

que presentó

M. en B. Daniel Cisneros Torres

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa
Co-Director: Dra. María del Pilar Nicasio Torres
Asesor: Dr. Manasés González Cortázar

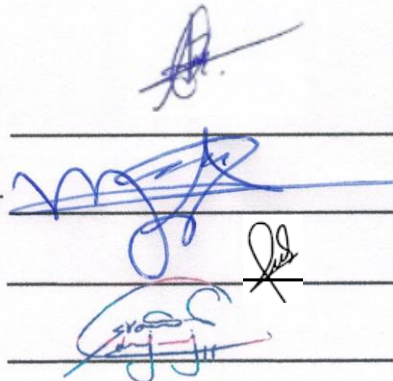
Jurado:

Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero

Secretario: Dr. Manasés González Cortazar

Vocal: Dra. María Aurora Martínez Trujillo

Vocal: Dra. Sandra Luz Cabrera Hilerio



The image shows four horizontal lines, each with a handwritten signature in blue ink. The signatures are positioned to the right of the corresponding names in the 'Jurado' section. The first signature is for Dra. Angélica Román Guerrero, the second for Dr. Manasés González Cortazar, the third for Dra. María Aurora Martínez Trujillo, and the fourth for Dra. Sandra Luz Cabrera Hilerio.

ÍNDICE

	Páginas
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN	8
II. ANTECEDENTES	10
2.1 Especie de estudio: <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	10
2.1.1 Usos tradicionales	11
2.1.2 Farmacología y fitoquímica	11
2.1.3 Situación ecológica	13
2.1.4 Propagación vegetativa y micropropagación de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	14
2.2 Metabolitos secundarios	14
2.3 Cultivo de células en suspensión	15
2.3.1 Aplicación del cultivo de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico	16
2.4 Efecto del nitrato como fuente de nitrógeno en el metabolismo celular	20
2.5 Efecto del cobre en el metabolismo celular	24
2.6 Diseño Experimental: Metodología de Superficie de Respuesta	27
2.7 Úlcera péptica	30
2.7.1 Modelos <i>in vivo</i> para inducir úlceras gástricas	33
2.7.2 Compuestos antiulcerogénicos en extractos de plantas	35
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
IV. JUSTIFICACIÓN	38
V. HIPÓTESIS	38
VI. OBJETIVOS	39
6.1 Objetivos Generales	39
6.2 Objetivos Particulares	39

VII. MATERIALES Y MÉTODOS	40
7.1 Cultivos <i>in vitro</i> de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	40
7.1.1 Cultivo de callos	40
7.1.2 Cultivo de células en suspensión	40
7.2 Cinéticas de crecimiento del cultivo de células en suspensión	41
7.2.1 Crecimiento celular	41
7.2.2 Extracción de células en suspensión	42
7.2.3 Condiciones de CLAR para análisis de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina	42
7.3 Efecto del nitrato y cobre en el crecimiento celular y en la producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina	43
7.3.1 Diseño experimental	43
7.3.2 Determinaciones analíticas	47
7.3.2.1 Crecimiento celular	47
7.3.2.2 Rendimiento de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina	47
7.4. Obtención del extracto metanólico y fracciones activas del cultivo de células en suspensión de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i>	47
7.4.1 Identificación de escopoletina y ácido <i>p</i> -cumárico	49
7.4.2 Grupos animales	51
7.4.3 Inducción de lesiones gástricas con etanol absoluto	51
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
8.1 Crecimiento celular	52
8.2 Producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina	59
8.2.1 Producción de biomasa y compuestos activos en cultivos de células en suspensión en lote de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> en las condiciones nutricionales determinadas con la MSR	64
8.3 Extracto metanólico y fracciones activas del cultivo de células en suspensión de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i>	68
8.3.1 Identificación de esculina y esculetina en las fracciones derivadas del extracto metanólico TaM	70
8.3.2 Identificación de escopoletina en la subfracción TaMC2-13	73
8.3.3 Efecto gastroprotector del extracto metanólico y fracciones del cultivo	77

de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*

IX. CONCLUSIONES	81
X. PERSPECTIVAS	83
XI. REFERENCIAS	84
XII. ANEXOS	104

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Método cromatográfico para la separación de compuestos fenólicos escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina.	43
Tabla 2. Matriz del DF 2 ^K utilizado para el establecimiento de cinéticas de crecimiento y producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en cultivos de células en suspensión de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> .	45
Tabla 3. Matriz del diseño DCC utilizado para el crecimiento y producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en cultivos de células en suspensión de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> .	46
Tabla 4. Condiciones de fraccionamiento en columna del extracto metanólico de biomasa de células en suspensión de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> .	48
Tabla 5. Condiciones de separación cromatográfica en columna de la fracción TaM-2.	49
Tabla 6. Sistema de elución cromatográfica por CLAR para el análisis de las fracciones del extracto metanólico de células en suspensión de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> .	50
Tabla 7. Condiciones de separación cromatográfica en columna de la subfracción TaMC2D2.	50
Tabla 8. Producción de máxima biomasa, escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en la suspensión celular de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> después de 14 días de cultivo y los coeficientes obtenidos en el DF 2 ^K .	55
Tabla 9. Matriz del DCC usada para el análisis del contenido de nitratos totales y cobre en el medio MS para la producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en el cultivo de células en suspensión de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> .	56
Tabla 10. Efecto de las concentraciones de nitratos totales y cobre en los rendimientos de producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en las suspensiones celulares de <i>Tilia americana</i> var.	61

mexicana después de 14 días de cultivo.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de crecimiento de los cultivos de células en suspensión en lote en las condiciones nutricionales determinadas con la MSR y en el medio MS completo en sales. 65

Tabla 12. Producción de compuestos activos en el medio MS completo en sales y en los mejores medios obtenidos con la MSR. 67

Tabla 13. Efecto gastroprotector del extracto metanólico (TaM) y sus fracciones sobre la formación de úlceras inducidas con etanol en ratón. 77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Fotografía de hojas, inflorescencias y brácteas de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> . Obtenido de http://chalk.richmond.edu/biology/trees/htmls/tilia_americana.htm .	10
Figura 2. Flavonoides que integran la fracción con actividad ansiolítica de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> .	12
Figura 3. Estructura química de la escopoletina.	13
Figura 4. Relaciones entre el metabolismo primario y secundario de las plantas, origen biosintético de los principales grupos de compuestos secundarios y detalle de la Ruta del ácido shikímico. TAL: tirosina amonio liasa; PAL: fenilalanina amonio liasa; C4H: cinamato 4-hidroxilasa. Adaptado de Piñol et al., 2013.	23
Figura 5. Modelo para inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios por elicitor biológico o con metales pesados. Adaptado de Mithöfer et al., 2004.	26
Figura 6. Anatomía del estómago. Sección transversal de la pared del estómago. Adaptado de Boron y Boulpaep (2017).	31
Figura 7. Imágenes de la biomasa de callos derivados de explantes de hoja generados con 2.0 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L ⁻¹ KIN (a), de los cultivos en suspensión de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> establecidos	52

con esos callos (b, c, d,) y teñidos con Azul de Evans y observados al microscopio a 10X (e).

Figura 8. Cinéticas de crecimiento y producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en los cultivos en lote de células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana*. 53

Figura 9. Superficies de respuesta de a) producción de biomasa máxima, b) rendimiento de escopoletina y c) rendimiento de 3-O- β -D-glucósido de quercetina en el Diseño Compuesto Central en los cultivos de células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana*. 57

Figura 10. Efecto del contenido total de nitratos y cobre en el medio MS probado en el DCC en el crecimiento de la suspensión celular: a) 8.03 mM NO₃⁻, 0.01 μ M Cu²⁺; b) 46.77 mM NO₃⁻, 0.1 μ M Cu²⁺; c) 27.4 mM NO₃⁻, 0 μ M Cu²⁺; d) 27.4 mM NO₃⁻, 1.2 μ M Cu²⁺; e) 27.4 mM NO₃⁻, 0.1 μ M Cu²⁺. 58

Figura 11. Cromatogramas y espectros de absorción obtenidos de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en (a) el extracto metanólico del cultivo de células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana* y (b) en el extracto metanólico con estándares. 59

Figura 12. Cinéticas de producción de biomasa en las condiciones nutricionales determinadas con la MSR para la producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina y en el medio MS completo en sales. 64

Figura 13. Cinéticas de producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en los mejores tratamientos elegidos con la MSR y su comparación con el medio MS basal. 66

Figura 14. Cromatoplasmas de silica gel (A) y silica gel RP-18 (B) de las fracciones del extracto metanólico TaM de la biomasa de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* observadas a 254 nm (1) y 365 nm (2). Sistemas de elución: A) CH₂Cl₂:CH₃OH (7:3) y B) H₂O:CH₃CN (5:5). Estándares de esculetina (Et), esculina (El), escopoletina (Ep) y 3-O- β -D-glucósido de quercetina (GQ). 1: fracción TaM-1, H₂O (100%); 2: fracción TaM-2, H₂O:CH₃CN (9:1); 3: fracción 69

TaM-3, H₂O:CH₃CN (8:2); 4: fracción TaM-4, H₂O:CH₃CN (7:3); 5: fracción TaM-5, H₂O:CH₃CN (5:5); 6: fracción TaM-6, H₂O:CH₃CN (3:7).

Figura 15. Cromatoplasmas de silica gel RP-18 con las sub-fracciones 69

obtenidas de la fracción TaM2 observadas a $\lambda = 365$ nm. Sistema de elución H₂O:CH₃CN (7:3). Estándares de esculetina (Et), esculina (El), escopoletina (Ep). Ref: Referencia de la fracción TaM-2; A): fracciones TaMC2-4, TaMC2-5 y TaMC2-6 (alícuotas 20 a 25) eluidas con el sistema H₂O:CH₃CN (9:1); B) fracción TaMC2-7 (alícuotas 26 a 28) eluida con H₂O:CH₃CN (9:1) y fracciones TaMC2-8 (alícuota 29), TaMC2-9 (30) y TaMC2-10 (31) eluidas con H₂O:CH₃CN (85:15); C) fracción TaMC2-13 (alícuotas 37 a 43) eluida con H₂O:CH₃CN (80:20).

Figura 16. Cromatogramas y espectros de absorción de los 71
compuestos identificados en la fracción TaMC2-5 (a) y de los estándares comerciales de esculina (b), esculetina (c) y escopoletina (d) observados a $\lambda = 344$ nm.

Figura 17. Cromatogramas y espectros de absorción de los 72
compuestos identificados en las subfracciones derivadas de la fracción TaM-2 analizadas por CLAR: a) TaMC2-5, b) TaMC2-9, c) TaMC2-13.

Figura 18. Cromatogramas y espectro de absorción de las 73
subfracciones (a) TaMC2D y (b) TaMC2ACoEt observados a 344 y 330 nm, respectivamente.

Figura 19. Cromatoplasma de fase normal de las fracciones obtenidas 74
de la fracción TaMC2D2 observadas a 254 nm (A) y 365 nm (B). Sistema de elución CH₂Cl₂:MeOH (9:1). Estándares de escopoletina (Ep), esculina (El), esculetina (Et). Ref: referencia de la subfracción TaMC2D2. 1 y 2: fracciones eluidas con CH₂Cl₂ (100%); 7 y 8: fracciones eluidas con CH₂Cl₂ (100%) y CH₂Cl₂:MeOH (95:5) respectivamente.

Figura 20. Cromatogramas y espectros de absorción de las 76
subfracciones derivadas de TaMC2D2: (a) TaMC2D2-1, 344 nm; (b)

TaMC2D2-3, 310nm; (c) lavado TaMC2D2-6, 310nm; (d) estándar de ácido *p*-cumárico, $\lambda = 310$ nm.

Figura 21. Efecto gastroprotector del extracto metanólico TaM (c) y las fracciones TaMC2-5 (d) y TaCM2-9 (e) comparados con la famotidina (a) y el vehículo (b).

78

ABREVIATURAS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
$\mu_{\text{máx}}$	velocidad específica de crecimiento máxima
AINEs	Antiinflamatorios no esteroidales
ANOVA	análisis de varianza
ATP	Adenosín trifosfato
$B_{\text{máx}}$	biomasa máxima
CCF	cromatografía de capa fina
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
DCC	Diseño Compuesto Central
DE	Diseño en Estrella
DE_{50}	dosis efectiva media
DF 2^k	Diseño Factorial 2^k
EROs	especies reactivas de oxígeno
rf	frente de referencia
Ic	índice de crecimiento
KIN	cinetina
msnm	metros sobre el nivel del mar
MS	medio de Murashige y Skoog
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
NADPH	la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PS	peso seco
P/V	relación peso/volumen
rpm	revoluciones por minuto
SEMARNAT	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
TFA	ácido trifluoroacético
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
v/v	relación volumen/volumen
Y	rendimiento de biomasa celular producida respecto a la sacarosa

RESUMEN

Tilia americana var. *mexicana* es un árbol ampliamente distribuido en el territorio nacional, cuyas flores y brácteas son utilizadas principalmente en la medicina tradicional mexicana debido a efectos sedantes y ansiolíticos, propiedades que las hacen populares para tratar padecimientos como el insomnio y los “nervios”. Estas propiedades farmacológicas se han atribuido principalmente a los derivados glicosilados de la quercetina y el kaempferol como el 3-O- β -D-glucósido de quercetina y el tilirósido. Otros de los usos tradicionales que se le han atribuido a esta especie han sido para tratar la gastroenteritis, las hemorroides, el dolor y el reumatismo. Debido a la tala inmoderada de los árboles de tilia por la explotación de su madera y la comercialización de sus inflorescencias, la SEMARNAT ha identificado a este árbol con base en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como una especie en peligro de extinción. Una alternativa para proteger y promover el uso racional de esta especie es mediante el empleo de técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales, tal es el caso del cultivo de células en suspensión que permite disponer de material vegetal productor de los compuestos responsables de las actividades biológicas que se le atribuyen.

En este trabajo de investigación, a partir de un cultivo de callos derivados de explantes de hoja, se estableció un cultivo tipo lote de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) completo en sales (27.4 mM de nitratos totales y 0.1 μ M de cobre) suplementado con 2.0 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.5 mg L⁻¹ kinetina (KIN), 30.0 g L⁻¹ de sacarosa y agua de coco al 5%. Al inicio, la suspensión celular presentó coloración café oscuro y agregados celulares de tamaños irregulares, después de varios subcultivos se generó una suspensión celular de agregados de tamaño pequeño (<5 mm) con células libres (<250 μ m) de color café claro. Posteriormente se caracterizó el cultivo realizando cinéticas de crecimiento y producción de metabolitos secundarios farmacológicamente activos, a través del registro de los pesos secos de las biomásas obtenidas a diferentes tiempos de cultivo y su análisis químico de dichas biomásas. El crecimiento de la suspensión celular de *T. americana* var. *mexicana* se caracterizó con base en los parámetros cinéticos como I_c (4.8 \pm 0.88), t_d (6.60 \pm 0.78 d), $\mu_{m\acute{a}x}$ (0.107 \pm 0.01 d⁻¹), $B_{m\acute{a}x}$ (17.86 g_{PS} L⁻¹) y rendimiento Y (0.637 \pm 0.067 g_{PS} g_{sacarosa}⁻¹).

La biomasa producida en cada cinética se extrajo con metanol y en estos extractos se identificó por CLAR la presencia de 3-O- β -D-glucósido de quercetina (ansiolítico) y de escopoletina (antiinflamatorio), los datos de tiempos de retención y espectros de absorción se compararon con los de estándares comerciales. La cuantificación de los compuestos activos se realizó por el método del estándar externo. La producción de los compuestos activos estuvo asociada al crecimiento celular, la máxima biomasa y producción de metabolitos se obtuvo a los 14 días de cultivo y no se observó excreción al medio de cultivo.

La producción de los compuestos escopoletina y del 3-O- β -D-glucósido de quercetina se estimuló mediante la modificación de las condiciones nutrimentales del medio MS, nitratos totales y cobre, reportados como elicitores abióticos para incrementar la producción de compuestos fenólicos. Para tal propósito, se empleó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) que consiste en establecer el Diseño Factorial (DF) 2^K , en donde las variables independientes X_1 = nitratos totales (27.4 mM, 11.5 mM KNO_3 y 15.9 mM NH_4NO_3) y X_2 = cobre (0.1 μM CuSO_4) se codificaron en dos niveles (+1, -1), establecidos a partir de los valores iniciales de estas sales en el medio de cultivo MS completo. Dichos valores iniciales se tomaron como los puntos centrales del diseño. Las tres variables a optimizar fueron la biomasa máxima ($Y_1 = B_{\text{máx}}$) y la producción de escopoletina (Y_2) y de glucósido de quercetina (Y_3). De acuerdo con los coeficientes β del modelo obtenido con los resultados del DF 2^K , el efecto negativo de los nitratos totales y el efecto positivo del cobre indicaron que, de manera independiente o en combinación, los niveles de nitratos totales deben reducirse y el cobre debe incrementar para optimizar el crecimiento de la suspensión celular. Los mayores valores de biomasa máxima en peso seco ($B_{\text{máx}}$) se obtuvieron con 13.7 mM de NO_3^- en combinación con 1 μM Cu^{2+} . El DF 2^K mostró que la reducción de nitratos, así como el incremento en las concentraciones de cobre, independientemente o en combinación, favorecieron la producción de escopoletina; mientras que para la producción de 3-O- β -D-glucósido de quercetina las concentraciones de nitratos y cobre deben disminuir independientemente o en combinación.

La siguiente etapa consistió en completar el DF 2^K para tener un Diseño Compuesto Central (DCC), agregando los puntos -1.414, 0, +1.414 correspondientes al diseño de estrella (Montgomery y Evans, 1975; Montgomery et al., 2012). Con el desarrollo del DCC fue posible identificar el punto de inflexión en la concentración de los elicitores para estimular la producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina, considerando como variable

los rendimientos. Los coeficientes β del modelo del DCC indicaron que la concentración de nitratos totales debe reducirse y/o la concentración de cobre incrementar, de manera independiente uno del otro en la formulación del medio de cultivo MS, para favorecer la producción de escopoletina. La máxima producción de escopoletina (que significó un incremento de aproximadamente 3 veces respecto a la producción inicial) se obtuvo en los medios que contenían 27.4 mM de NO_3^- y 1.2 μM de Cu^{2+} .

Por el contrario, para favorecer la producción del 3-O- β -D-glucósido de quercetina, las concentraciones de nitratos totales y cobre deben reducirse de manera independiente uno del otro en la formulación del medio de cultivo MS. La mejor condición para incrementar, aproximadamente 3 veces la producción de este compuesto se obtuvo en el medio que contenía 8.03 mM de NO_3^- y 0.1 μM de Cu^{2+} . El contenido de NO_3^- y Cu^{2+} que favorece la producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina afectó el crecimiento celular de la suspensión celular de *T. americana* var. *mexicana*; a partir de lo anterior, la mejor condición para incrementar el crecimiento celular se alcanzó al utilizar 13.7 mM de NO_3^- y 1 μM de Cu^{2+} .

La última etapa de la investigación consistió en evaluar el extracto metanólico (TaM) del cultivo de células en suspensión desarrollado en el medio MS basal, y las fracciones derivadas del extracto íntegro en un modelo murino de úlceras gástricas inducido con etanol absoluto. El fraccionamiento cromatográfico del TaM permitió obtener 17 fracciones, de las cuales tres de ellas presentaron compuestos de naturaleza cumarínica: esculetina y esculina (TaMC2-5 y TaMC2-9) y escopoletina (TaMC2-13); la subfracción TaMC2-5 presentó derivados del ácido gálico y de la subfracción TaMC2-13 se aisló el ácido *p*-cumárico.

Los ratones tratados con el extracto TaM (70.14 \pm 19.33%) y la fracción TaMC2-9 (78.27 \pm 11.88%) mostraron un efecto gastroprotector similar a las concentraciones evaluadas; este efecto podría deberse a la presencia de las cumarinas. El extracto íntegro TaM presentó la mezcla de esculetina, esculina y escopoletina entre otros compuestos, y en la fracción TaMC2-9 están presentes esculetina y esculina. Para demostrar su efecto es necesario purificar estas cumarinas y evaluarlas de manera individual, así como analizar las citocinas pro y antiinflamatorias de los estómagos de los ratones tratados con TaM y TaMC2-9 conocer de manera molecular el efecto gastroprotector presentado. La escopoletina ha demostrado inhibir la biosíntesis de la prostaglandina PGE_2 , el factor de necrosis tumoral $\text{TNF-}\alpha$ y las interleucinas proinflamatorias $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 ; además de suprimir la expresión de la

isoforma 2 de la COX-2 a una concentración dosis dependiente ($1-50 \mu\text{g mL}^{-1}$) en un modelo *in vitro* de inflamación.

ABSTRACT

Tilia americana var. *mexicana* is a tree widely distributed in the national territory, its flowers and bracts are mainly used in traditional Mexican medicine due to their sedative and anxiolytic effects, properties that make them popular for treating conditions such as insomnia and "nerves". These pharmacological properties have been mainly attributed to the glycosylated derivatives of quercetin and kaempferol such as quercetin 3-O- β -D-glycoside and tiliroside. In addition to its traditional use in these conditions, its medicinal use is also reported in cases of gastroenteritis, haemorrhoids, pain and rheumatism. Due to excessive felling of *tilia*'s trees due to the exploitation of their wood and the commercialization of their inflorescences, Mexican Ministry of the Environment and Natural Resources (SEMARNAT) has identified this tree based on NOM-059-SEMARNAT-2010 as an endangered species. An alternative to protect and promote the rational use of this species, is through the use of biotechnological tools such as plant cell tissue culture, such is the case of cell suspension culture that allows having plant material that produces the compounds responsible for the biological activities attributed to it.

In this research work, a batch-cell suspension culture of *T. americana* var. *mexicana* was established from a callus culture derived from leaf explants, in 250 mL Erlenmeyer flasks, with MS culture medium complete in salts (27.4 mM total nitrates and 0.1 μM copper) supplemented with 2.0 mg L⁻¹ dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.5 mg L⁻¹ kinetin (KIN), 30.0 g L⁻¹ sucrose and 5% coconut water. Initially, the cell suspension presented dark brown coloration and irregularly sized cell aggregates, after several subcultures a cell suspension of small aggregates (<5 mm) was generated with free cells (<250 μm) and light brown colour. Later, the culture was characterized by performing growth and production kinetics of pharmacologically active secondary metabolites, by registering the dry weight of the biomass obtained at different cultivation times and their chemical analysis. The growth of the cell suspension of *T. americana* var. *mexicana* was characterized based on kinetic parameters such as growth rate I_c (4.8 ± 0.88), doubling time t_d (6.60 ± 0.78 d), specific growth rate $\mu_{\text{máx}}$

($0.107 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$), maximal biomass B_{max} ($17.86 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ L}^{-1}$) and the cellular biomass produced with respect to added sucrose Y ($0.637 \pm 0.067 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}_{\text{sucrose}}^{-1}$).

The biomass produced in each kinetic was extracted with methanol and the presence of quercetin 3-*O*- β -D-glucoside (anxiolytic) and scopoletin (anti-inflammatory) was identified in these extracts by CLAR. The retention time and absorption spectra data were compared with that of commercial standards. The quantification of the active compounds was carried out by the external standard method. The active compound production was associated with cell growth, the maximal production of biomass and metabolites was at 14th day of culture and no excretion was observed in the culture medium.

The production of compounds scopoletin and quercetin 3-*O*- β -D-glycoside was stimulated by modifying the nutritional conditions of the MS medium, total nitrates and copper reported as abiotic elicitors to increase the production of phenolic compounds. For this purpose, the Surface Response Methodology (MSR) was used, which consists of establishing the Factorial Design 2^k (DF 2^k) and coding the independent variables X_1 = total nitrates (27.4 mM, 11.5 mM KNO_3 and 15.9 mM NH_4NO_3) and X_2 = copper ($0.1 \mu\text{M CuSO}_4$) on two levels (+1, -1), established from the initial values of these salts in the complete MS culture medium. These initial values were taken as the central points of the design. The three variables to be optimized were the maximal biomass ($Y_1 = B_{\text{max}}$) and the production of scopoletin (Y_2) and quercetin 3-*O*- β -D-glycoside (Y_3). According to the DF 2^k β coefficients, the negative effect of total nitrates and the positive effect of copper indicated that, independently or in combination in the culture medium, total nitrate levels should be reduced and copper levels should be increased to optimize the growth of the cell suspension. The highest B_{max} values were obtained with 13.7 mM of NO_3^- in combination with $1 \mu\text{M Cu}^{2+}$. DF 2^k showed that the reduction of nitrates, as well as the increase in copper concentrations, independently or in combination, favoured the production of scopoletin; whereas for quercetin 3-*O*- β -D-glycoside production, the concentrations of nitrates and copper must decrease independently or in combination in the culture medium.

The next stage consisted of completing DF 2^k to have a Central Composite Design (DCC) adding the points -1.414, 0, +1.414 corresponding to the star design. With the development of DCC, it was possible to identify the inflection point in the concentration of elicitors to stimulate the production of scopoletin and quercetin 3-*O*- β -D-glycoside. The β coefficients of the DCC model indicated that the total nitrates concentration should be reduced and/or the copper

concentration should be increased, independently of each other in the formulation of the MS culture medium to favour the scopoletin production considering as variable yields. The maximal scopoletin production (approximately 3-fold increase with respect to the initial production) was obtained in the media containing 27.4 mM of NO_3^- and 1.2 μM of Cu^{2+} .

On the contrary, to favour the quercetin 3-O- β -D-glycoside production, the concentrations of total nitrates and copper should be reduced independently of each other in the formulation of the MS culture medium. The best conditions to increase the production of this compound, approximately 3-fold times, was in the medium contained 8.03 mM of NO_3^- and 0.1 μM of Cu^{2+} . The NO_3^- and Cu^{2+} contents that favours the production of scopoletin and quercetin 3-O- β -D-glycoside affected the cell growth of the *T. americana* var. *mexicana*, the best condition to increase cell growth was achieved by using 13.7 mM of NO_3^- and 1 μM of Cu^{2+} .

The last stage of the investigation consisted of evaluating the methanolic extract (TaM) of cell suspension culture developed in the basal MS medium, and the fractions derived from the whole extract in a murine model of gastric ulcers induced with absolute ethanol. Chromatographic fractionation of TaM allowed obtaining 17 fractions, three of them presented compounds of coumarinic nature: esculetin and esculin (TaMC2-5 and TaMC2-9) and scopoletin (TaMC2-13). In addition, the TaMC2-5 subfraction presented gallic acid derivatives and from TaMC2-13 subfraction *p*-coumaric acid was isolated.

Mice treated with the TaM extract ($70.14 \pm 19.33\%$) and the TaMC2-9 fraction ($78.27 \pm 11.88\%$) showed a similar gastroprotective effect at the concentrations evaluated; this could be due to the presence of coumarins. The complete TaM extract presents the mixture of esculetin, esculin and scopoletin, in addition to other compounds, and in the TaMC2-9 fraction only esculetin and esculin are present. In order to demonstrate its effect, it will be necessary to purify and identify the compounds present in TaMC2-9 and individually evaluate their gastro-protective effect., as well as to analyze the pro- and anti-inflammatory cytokines of the mouse stomachs treated with TaM and TaMC2-9 to know molecularly the presented gastroprotective effect. Scopoletin has been shown to inhibit the biosynthesis of prostaglandin PGE_2 , tumor necrosis factor $\text{TNF-}\alpha$ and pro-inflammatory interleukins $\text{IL-1}\beta$ and IL-6 ; in addition to suppressing expression of COX-2 isoform 2 at a dose-dependent concentration ($1\text{-}50 \mu\text{g mL}^{-1}$) in an *in vitro* inflammation model.

I. INTRODUCCIÓN

Tilia americana var. *mexicana* es un árbol ampliamente distribuido en México en climas cálido, semicálido y templado, entre los 1000 y los 2000 msnm (Aguirre et al., 2010). Las hojas, brácteas e inflorescencias del árbol se utilizan principalmente en la medicina tradicional para el tratamiento de trastornos nerviosos como insomnio, dolor de cabeza y malestar en general (Argueta et al., 1994; Adame y Adame, 2000); además, se reporta su uso para el tratamiento de la gastroenteritis, hemorroides, tratamiento del dolor y reumatismo (Monroy-Ortíz y Castillo-España, 2007). En las brácteas e inflorescencias de la tilia se han identificado flavonoides derivados de quercetina y kaempferol, los cuales han validado las actividades ansiolíticas atribuidas a la especie (Noguerón-Merino et al., 2015; Herrera-Ruiz et al., 2008); asimismo, se han identificado luteolina y apigenina, taninos, cumarinas, ácidos fenil carboxílicos y polifenoles (Pérez et al., 2008; Aguirre-Hernández et al., 2010; Noguerón-Merino et al., 2015). La cumarina escopoletina y los flavonoides 3-O- β -D-glucósido de quercetina y tilirósido se identificaron en los extractos metanólicos de hojas de plantas silvestres y de callos de *T. americana* var. *mexicana*, a estos compuestos se les atribuyó actividad antiinflamatoria al ser activos en el modelo de inflamación auricular inducida con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Flores-Sánchez et al., 2019).

La colecta desmedida de flores y brácteas para tratar estos padecimientos limitan la propagación sexual de la especie, además la tala inmoderada de los árboles de tilia por su madera ha causado que la especie se encuentre en peligro de extinción (SEMARNAT 2010), debido a esto es necesario emplear herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales de plantas de interés farmacológico, específicamente del cultivo de células en suspensión para disponer de manera sustentable y controlada de los metabolitos secundarios, los cuales pueden tener amplio potencial comercial debido a sus actividades biológicas diversas (Zhou y Wu, 2006; Karuppusamy, 2009).

La producción de los metabolitos secundarios en suspensiones celulares puede ser estimulada por el uso de elicitores bióticos (como el metil-jasmonato) o abióticos (como los metales pesados), los cuales inducen una condición de estrés en las células y dirigen la respuesta a la producción de compuestos como las fitoalexinas (Namdeo, 2007; Ramawat y Mathur, 2007; Bhojwani y Dantu, 2013). También la modificación de las condiciones nutricionales del medio de cultivo es utilizada para promover la producción de

metabolitos secundarios es la modificación de la relación carbono/nitrógeno (Bhojwani y Dantu, 2013).

El empleo de diseños experimentales permite conocer estadísticamente las relaciones entre la entrada y salida de variables en sistemas y procesos de producción donde ocurren transformaciones físicas, químicas o biológicas. Los bioprocesos que demandan medios de cultivo complejos pueden beneficiarse del diseño de experimentos para evitar sesgos experimentales y reducir significativamente la cantidad requerida de experimentos. Por tanto, es necesario conducir experimentos de barrido o detección de factores que afectan el resultado experimental, tal es el caso de las metodologías de superficie de respuesta (Van Ryswyk y Van Hecke, 1991; Hanchinal et al., 2008; Mandenius, 2016).

La enfermedad de úlcera péptica es un problema global con un riesgo de desarrollo de por vida que varía del 5% al 10% (Lanas y Chan, 2017; Snowden, 2008). En general, hay una disminución en su incidencia en todo el mundo debido a la mejora de las condiciones higiénicas y sanitarias combinadas con un tratamiento efectivo y el uso juicioso de los AINEs o medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (Lanas y Chan, 2017). Esta enfermedad resulta de un desequilibrio entre los mecanismos protectores de la mucosa gastrointestinal, como la secreción de moco y bicarbonato, y los destructivos como el ácido gástrico y la pepsina (Malik et al., 2020).

Se han reportado distintos extractos de plantas con actividad antiulcerogénica, en los cuales se han identificado compuestos de naturaleza fenólica como los flavonoides, el ácido cafeico y sus derivados (Chen et al., 2017). Investigaciones recientes sugieren el uso de medicamentos a base de hierbas en el tratamiento de la úlcera péptica, ya que son económicos y tienen menos efectos secundarios. Los compuestos fenólicos como los flavonoides, los quinones, los taninos y los glucósidos fenólicos tienen un efecto antiulcerogénico a través de diferentes mecanismos (Chatterjee y Bandyopadhyay, 2014). Es posible que los compuestos activos presentes en los extractos metanólicos del cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* presenten actividad antiulcerogénica, la cual podría validar el uso tradicional de esta especie para tratar padecimientos asociados con la inflamación y conducir al desarrollo de un fitofármaco de origen natural basado en un proceso biotecnológico.

II. ANTECEDENTES

2.1 Especie de estudio: *Tilia americana* var. *mexicana*

El género *Tilia* L. (Tiliaceae) comprende cerca de 25 especies distribuidas a nivel mundial en el Oriente de Asia (17 especies), Europa (6 especies) y América del Norte (1 especie) (Tang y Zhuge, 1996, citado por Aguirre-Hernández et al., 2010).

En México se han descrito 15 especies de *Tilia* basadas en las características morfológicas de sus hojas y son reconocidos como una de las cuatro variedades de *Tilia americana* (Aguirre-Hernández et al., 2010). Actualmente el Missouri Botanical Garden (<http://www.tropicos.org>; www.mobot.org) indica la clasificación taxonómica de *Tilia americana* como perteneciente a la familia Malvaceae, género *Tilia*, especie *Tilia americana* L. variedad *mexicana*: *Tilia americana* L. variedad *mexicana* (Schlecht) Hardin (Figura 1).



Figura 1. Fotografía de hojas, inflorescencias y brácteas de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Obtenido de http://chalk.richmond.edu/biology/trees/htmls/tilia_americana.htm.

Tilia americana var. *mexicana* es un árbol de corteza recta y lisa, de hasta 15 m de altura, presenta follaje vistoso compuesto por hojas de color verde claro a verde oscuro, de 8 a 14 cm de largo en forma de corazón y ápice puntiagudo con los bordes dentados. Sus flores son fragantes de color amarillento y blanco, agrupadas en inflorescencias sobre una bráctea membranosa de donde los frutos rematan en un ramillete; el fruto es esférico y tomentoso, de unos 7 mm, con una o dos semillas. La época de floración se da entre los meses de abril a junio (Martínez y Matuda, 1979; Argueta et al., 1994; Pavón y Rico-Gray, 2000).

T. americana var. *mexicana* se distribuye en 14 estados de la República Mexicana, desde Chihuahua y Coahuila hasta Guerrero y Oaxaca (Martínez y Matuda, 1979; Adame y Adame, 2000; Pérez-Ortega et al., 2008). Se le encuentra en climas cálido, semicálido y templado,

entre los 1000 y los 2000 msnm (Aguirre et al., 2010). Crece en terrenos de cultivo o asociada a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino y de pino. De acuerdo a la región donde se encuentre recibe diversos nombres comunes, como cirimo, flordetila, tila, tilia (Morelos e Hidalgo), tirimo, tzirimo (Michoacán y Jalisco) y yaca (Oaxaca) (Martínez y Matuda, 1979; Martínez, 1987; Argueta et al., 1994).

2.1.1 Usos tradicionales

A nivel mundial, las especies de *Tilia* han sido usadas tradicionalmente como un sedante no narcótico para los desórdenes del sueño y la ansiedad (Viola et al., 1994; Coleta et al., 2001; Aguirre-Hernández et al., 2007; Pérez-Ortega et al., 2008; Aguirre-Hernández et al., 2010). Los tejidos aéreos (hojas, brácteas e inflorescencias) de *T. americana* var. *mexicana* se utiliza para el tratamiento de trastornos nerviosos como insomnio, dolor de cabeza y malestar en general (Argueta et al., 1994; Adame y Adame, 2000).

Las inflorescencias de *T. americana* var. *mexicana* se venden anualmente en mercados populares de pueblos localizados en distintas partes de México, como en Morelia, Michoacán (Luna, 1964; Hardin, 1990; Soto y Sousa, 1995). Se tiene reportes de que durante la época de floración (abril a junio) se incrementa la venta de las inflorescencias de esta especie, dado que se cree que su efecto medicinal es mayor durante este periodo (Pavón y Rico-Gray, 2000 citado por Pérez-Ortega et al., 2008). Este árbol también es utilizado tradicionalmente para la gastroenteritis, hemorroides, tratamiento del dolor y reumatismo (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana UNAM).

2.1.2 Farmacología y fitoquímica

Estudios farmacológicos del extracto metanólico de flores y brácteas de *T. americana* var. *mexicana* mostraron su efectividad sobre el sistema nervioso central, principalmente como ansiolítico demostrado en los modelos conductuales ambulatorio, laberinto elevado en forma de cruz, campo abierto, placa perforada y exploratorio empleando al diazepam como fármaco control (Aguirre-Hernández et al., 2007; Herrera-Ruiz et al., 2008). El fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico permitió obtener una fracción rica en flavonoides conformada principalmente por tilirósido, rutina, quercitrina, kaempferol y quercetina (Herrera-Ruiz et al., 2008, Figura 2). También se han identificado luteolina y

apigenina, taninos, cumarinas, ácidos fenil carboxílicos y polifenoles (Pérez et al., 2008; Aguirre-Hernández et al., 2010; Noguerón-Merino et al., 2015). La interacción de los flavonoides en la fracción estandarizada con fármacos serotoninérgicos (agonistas y antagonistas) sobre la actividad ansiolítica, fue evaluada en los modelos de laberinto elevado en cruz y campo abierto; la fracción mostró un efecto dosis-dependiente y tiene la habilidad de actuar a través del sistema serotoninérgico (Noguerón-Merino et al., 2015).

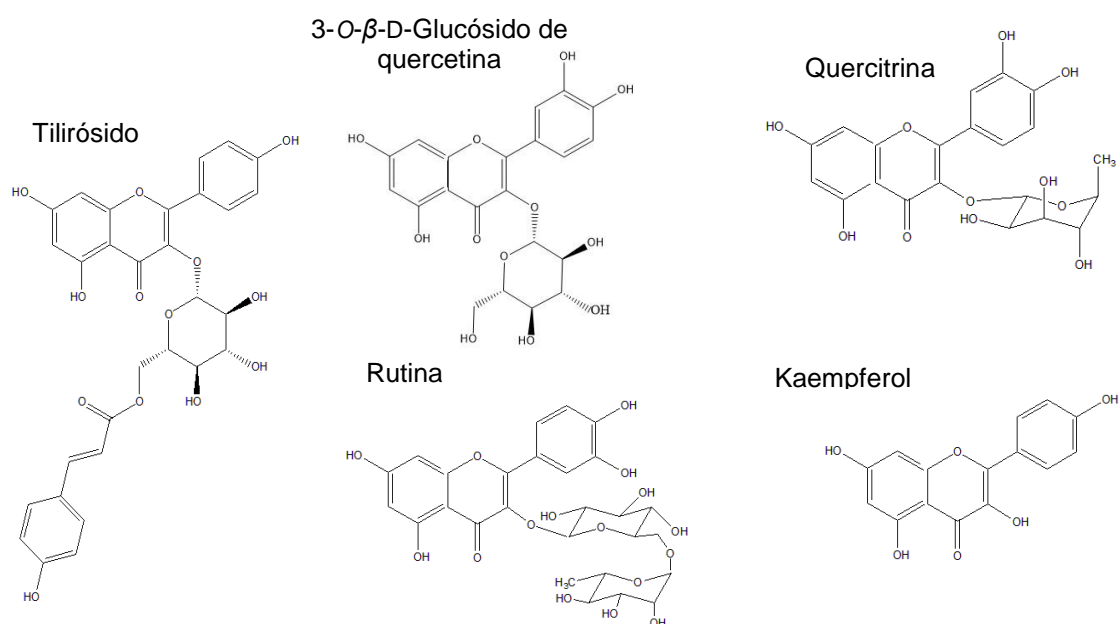


Figura 2. Flavonoides que integran la fracción con actividad ansiolítica de *Tilia americana* var. *mexicana*.

El extracto acuoso de inflorescencias de *T. americana* var. *mexicana* produjo un efecto antinociceptivo en modelos de deterioro funcional inducido, por inyección de ácido úrico y en el modelo de formalina en ratas; los análisis cromatográficos indicaron la presencia de glucósidos derivados de quercetina como los flavonoides responsables de esta actividad, mostrando evidencia de la participación de los receptores de serotonina 5-HT_{1A} en los efectos antinociceptivos producidos por la quercetina en el dolor inflamatorio (Martínez et al., 2009).

Por otra parte, se observó un efecto sinérgico al combinar los flavonoides quercetina, rutina e isoquercitrina (3-O-β-D-glucósido de quercetina) en la inhibición del sistema GABAérgico, como GABA/BDZ y el receptor de serotonina 5-HT1A, para lograr efectos sedantes y ansiolíticos (Aguirre-Hernández et al., 2016). Además, las propiedades neuroprotectoras de los extractos de hexano y acuoso de inflorescencias de *T. americana* fueron corroboradas en modelos de isquemia intestinal *in situ* e isquemia cerebral en ratones y cobayos (Ángeles-López et al. 2013, 2015).

Así mismo, se ha reportado la presencia de los flavonoides 3-O-β-D-glucósido de quercetina, tilirósido y la cumarina escopoletina (Figura 3) en los extractos metanólicos de hojas de plantas silvestres y de callos generados *in vitro* a partir de explantes de yemas apicales. Los extractos fueron evaluados en el modelo de inflamación auricular inducida con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), mostrando actividad antiinflamatoria, las dosis efectivas medias (DE₅₀) reportadas para el extracto de hojas y de callo fueron de 0.38 y 1.93 mg/oreja, respectivamente (Flores-Sánchez et al., 2019).

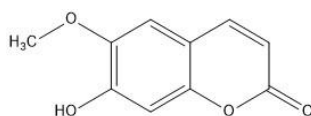


Figura 3. Estructura química de la escopoletina.

2.1.3 Situación ecológica

Actualmente la SEMARNAT ha catalogado a esta especie en peligro de extinción con base a la NOM-059-SEMARNAT-2010, debido a la pérdida del hábitat por el crecimiento desmedido de zonas urbanas y la sobreexplotación de los árboles de tilia. Los árboles son derribados para obtener las inflorescencias y las brácteas que se comercializan; además, debido a la flexibilidad de la madera también se sobreexplota para la fabricación de artesanías como instrumentos musicales y utensilios de cocina. Estas actividades impiden el desarrollo de frutos y semillas, limitando la propagación sexual de la especie y la regeneración de poblaciones naturales. Aunado a las dificultades que se presentan en la propagación por vía sexual debido a que las semillas cuentan con dos tipos de latencia: una exógena, donde la testa es impermeable al agua e impide el intercambio gaseoso con el medio exterior; y una endógena, donde el embrión es inmaduro (Santiago-Gregorio, 1998).

2.1.4 Propagación vegetativa y micropropagación de *Tilia americana* var. *mexicana*

Las técnicas de cultivos de tejidos son una herramienta biotecnológica vital en la búsqueda de alternativas de propagación *in vitro* de plantas y producción de compuestos de interés aislados de las mismas por su actividad farmacológica (Rao y Ravishankar, 2002). En este contexto *T. americana* var. *mexicana* se ha propagado vegetativamente, mediante el enraizamiento de estacas por la aplicación del enraizador comercial en polvo Radix 10,000 ppm de ácido 3-indolbutírico (AIB) empleando como sustrato arena. La proliferación de raíces se registró en 51.1% de los tallos de 20 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro, los cuales formaron 3 raíces/estaca (Muñoz-Flores *et al.*, 2011). Asimismo, se ha reportado la micropropagación de *T. americana* var. *mexicana* a partir de yemas de plántulas obtenidas por germinación de semillas (74%) tratadas con HCl al 10% por 5 min. La mayor multiplicación de brotes (7.75 brotes/explante) y brotes de mayor tamaño (3.53 cm) fueron generados en medio de cultivo MS con 0.10 mg L⁻¹ de ácido α -naftalénacético (ANA) y 0.25 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP). El enraizamiento de los brotes (100%) se logró en medio MS con 5.0 mg L⁻¹ de AIB, las plántulas resultantes fueron cultivadas bajo alta humedad relativa por cuatro semanas y posteriormente en invernadero por 90 días, lográndose un 70% de supervivencia (Zurita-Valencia *et al.*, 2014).

Flores-Sánchez *et al.* (2019) obtuvieron plantas completas de esquejes enraizados con AIB en condiciones de invernadero. Se establecieron múltiples cultivos de brotes a partir de yemas apicales y axilares de esquejes de *T. americana* var. *mexicana*. Las yemas apicales (75%) fueron el mejor explante para la inducción de brotes (2-3 brotes por explante) en medio MS suplementado con 2.0 mg L⁻¹ de BAP más 0.25 mg L⁻¹ de ANA. Además, se produjo callogénesis en ambos tipos de yemas en los tratamientos con 0.02 mg L⁻¹ de thidiazuron (TDZ) más 0.1 mg L⁻¹ de AIB.

2.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios protegen a las plantas de condiciones de estrés debido a que forman parte vital de los mecanismos de protección inducidos por el ataque de patógenos, el exceso de ozono, la radiación UV, las heridas de diversa procedencia, el frío, la falta de nutrientes minerales, etc. Estas condiciones inducen la expresión de genes que codifican varias enzimas de la ruta biosintética de compuestos fenilpropanoides, como la fenilalanina-

amonio liasa (PAL), *p*-cumarato coenzima A ligasa, la chalcona sintasa, la chalcona isomerasa o la cinamil alcohol deshidrogenasa. Los fenilpropanoides de estructuras más sencillas son las cumarinas, los psoralenos y los ácidos salicílico, cinámico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Estos ácidos suelen estar conjugados a carbohidratos de la pared celular, formando β -glucósidos del ácido salicílico o ésteres de los ácidos ferúlico o cinámico, o a ácidos orgánicos, formando el ácido clorogénico o ésteres del ácido sinápico. A partir del ácido *p*-cumárico se forman otros fenilpropanoides de estructura más compleja, como las antocianinas, los flavonoides, los pterocarpanos, los estilbenos y las auronas. Las antocianinas protegen el aparato fotosintético de la excesiva radiación UV, y también se relacionan con el estrés por frío y por deficiencia de fosfatos. El resto de los fenilpropanoides de estructura compleja, junto a las cumarinas y los psoralenos, presentan actividad antimicrobiana, y se han clasificado como fitoalexinas. Con excepción del ácido salicílico, el resto de los ácidos fenólicos de estructura simple son precursores de la lignina y la suberina, compuestos que se depositan en las paredes de las células que rodean la zona de infección para incrementar su rigidez y resistencia, de esta forma se mantienen aislados los patógenos y se dificulta la expansión de la infección (Tadeo y Gómez-Cárdenas, 2013).

2.3 Cultivo de células en suspensión

La producción de metabolitos secundarios por cultivo de células vegetales presenta distintas ventajas a la obtención *in vivo* en la planta completa: a) la producción puede ser confiable, más sencilla y predecible, b) el aislamiento del fitoquímico puede ser rápido y eficiente, c) los compuestos producidos *in vitro* pueden ser semejantes a los compuestos de la planta, d) en el cultivo de células se puede inhibir la producción de metabolitos no deseados, e) son un modelo potencial para elicitar la producción de compuestos (Karuppusamy, 2009).

El conocimiento de las condiciones de crecimiento y producción de metabolitos en el cultivo de células en suspensión permite optimizar su producción. Con tal finalidad se emplean estrategias de elicitación, proceso utilizado para estimular la producción de metabolitos secundarios como un mecanismo de defensa por las plantas para asegurar su supervivencia, persistencia y competitividad ante condiciones de estrés. La elicitación consiste en exponer al cultivo a una variedad de factores bióticos [enzimas inactivadas, fragmentos de la pared celular o polisacáridos (quitina, glucano) de microorganismos, glicoproteínas y fitoquímicos

producidos por la respuesta de las plantas a daño físico, ataque por hongos, levaduras o bacterias, moléculas señalizadoras como el ácido salicílico y el metil jasmonato] y abióticos (sales inorgánicas, radiación UV, metales pesados, alta salinidad, baja y alta osmolaridad, temperaturas extremas y altas presiones) (Namdeo, 2007; Ramawat y Mathur, 2007; Bhojwani y Dantu, 2013).

2.3.1 Aplicación del cultivo de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico

El desarrollo del cultivo de células en suspensión para la producción industrial de fitoquímicos ha sido explorado desde 1960, teniendo como resultado grandes intereses económicos alrededor del mundo, estimulando estudios intensivos en la producción de una amplia variedad de metabolitos secundarios de plantas como alcaloides, esteroides, terpenoides, quinonas, entre otros (Zhou y Wu, 2006). Algunas de los primeros productos comerciales fueron la shikonina obtenida de cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon* producidos por Mitsui Co. (Tabata y Fujita, 1985) y saponinas de cultivos celulares de *Panax ginseng* por Nitto Denko Co. (Zhou y Wu, 2006). El descubrimiento del paclitaxel y su uso clínico renovó el interés en el desarrollo de bioprocesos que involucran el cultivo de tejidos vegetales para la producción de metabolitos secundarios de alto valor farmacológico. El paclitaxel (Taxol[®], Bristol–Myers–Squibb Inc.) es un alcaloide diterpénico originalmente aislado de la corteza del tejo del pacífico *Taxus brevifolia*, se han utilizado cultivos celulares de este árbol en biorreactores de tanque agitado (hasta 30,000 L) para la producción de taxol y otros taxoides (Zhou y Wu, 2006). El paclitaxel y los compuestos relacionados se acumulan en bajos niveles en cultivos no estimulados, por lo el uso de metil jasmonato como estimulador ha sido implementado en líneas celulares de *T. canadensis* (Stafford, 2002; Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Wilson y Roberts, 2012).

Otros alcaloides con actividad anticancerígena como vinblastina y vincristina, el antihipertensivo ajmalicina y el sedante serpentina han sido aislados de *Catharantus roseus*, estos dos compuestos han sido producidos por cultivos celulares en matraces agitados y en biorreactor (Lee y Shuler, 2000; Rao y Ravishankar, 2002; Zheng et al., 2002; Zhou y Wu, 2006). De la planta china *Cephalotaxus fortunei*, usada clínicamente para tratar leucemia y linfomas malignos, se han aislado los alcaloides cefalotaxina y drupacina. Del cultivo de

células en suspensión de esta planta se identificaron además de harringtonina, homo e isoharringtonina, drupacina, siendo el alcaloide mayoritario la cefalotaxina. En cultivos de callos y células en suspensión de esta especie se han aplicado estrategias de modificación de temperaturas de cultivo (10-25°C) cada 12 h para estimular la producción de los alcaloides, detectando principalmente harringtonina y sus derivados homo e isoharringtonina (Hu et al., 1995; Zhang et al., 1998).

La camptotecina es un alcaloide indol monoterpénico con actividad anticancerígena derivado de *Camptotheca acuminata*, de la cual se han establecido cultivos de callos derivados de explantes de hoja productores de camptotecina (Pan et al., 2004). En cultivos de células en suspensión el ácido salicílico estimuló la producción de los isómeros isocamptotecina A y B (Yu et al., 2005). Los compuestos anticancerígenos topotecan (GlaxoSmithKline) e irinotecan (Pharmacia Corp/Aventis SA/Daiichi Seiyaku Co Ltd) son derivados semisintéticos de camptotecina. Se ha reportado su acumulación en cultivos de células en suspensión de *C. acuminata* y de *Nothapodytes foetida*. El rendimiento de los alcaloides en ambas especies fue posible modificarlo mediante el manejo de la composición de fitohormonas en el medio de cultivo (Stafford, 2002). Asimismo, la camptotecina ha demostrado actividad antiinflamatoria a una dosis de 0.1 mg kg⁻¹ en ratones con artritis experimental inducida con colágena (Koo et al., 2010).

Los antitumorales colchicina de *Colchium autumnale* y ellipticina de *Orchrosia elliptica* también se producen en suspensiones celulares (Smetanska, 2008; Wilson y Roberts, 2012). La colchicina es un fármaco usado desde la antigüedad para tratar la artritis gotosa, inhibe la inflamación por bloqueo de la interleucina 1 β (IL-1 β) en monocitos y por tanto inhibe su actividad quimiotáctica (Phelps, 1970).

La podofilotoxina es un ariltetralin lactona lignano con actividades antiviral y antineoplásica, utilizado como precursor para la síntesis de los productos comerciales etopósido y tenipósido. El establecimiento y caracterización de los cultivos de células en suspensión permitió inferir que el rendimiento de podofilotoxina, tiene un rango similar al de los cultivos no inducidos de varias especies productoras del compuesto de los géneros *Callitris* (Cupressaceae), *Linum* (Linaceae) y *Podophyllum* (Berberidaceae) (Stafford, 2002). Se

mostró que derivados semisintéticos de la podofilotoxina, como la deoxipicropodofilotoxina y el ácido turiférico, son potentes inhibidores del edema plantar inducido por carragenina (Guerrero et al. 2013).

No sólo metabolitos anticancerígenos son producidas por cultivos de tejidos vegetales, también otros que tienen efectos cardiovasculares, antimicrobianos y antioxidantes. Tal es el caso de las tanshinonas, pigmentos diterpenoides de quinona, principales compuestos activos de las raíces de *Salvia miltiorrhiza*, su producción se ha llevado a cabo en cultivos de raíces pilosas, y cultivos de células y células transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*. Se identificaron tanshinona I y IIA y criptotanshinona, compuestos derivados de tanshinona (Zhou y Wu, 2006).

Se han reportado cultivos de callos de *Ginkgo biloba* productores del diterpenoide antagonista del receptor del factor activador de plaquetas ginkgólido B, que además posee efecto neuroprotector. Estos cultivos celulares de *G. biloba*, además produjeron ginkgólido A y bilobálido (Li y Zhu, 1990; Zhou et al., 1992; Zhou y Wu, 2006). La shikonina y sus derivados se han aislado de las raíces de plantas de la familia de las Boragináceas, y han sido utilizados como antiinflamatorios y antimicrobianos, además de colorantes en cosméticos. Los cultivos de callos y células en suspensión de tres especies de esta familia, *Arnebia euchroma*, *Onosma paniculatum* y *Lithospermum erythrorhizon* han sido estudiados para la producción de shikonina (Lin y Wu, 2002; Zhou y Wu, 2006). Los cultivos también acumularon derivados de la shikonina como desoxishikonina, β -dimetilacrilol shikonina, acetilshikonina, β -hidroxiisovaleroil shikonina e isobutanoil shikonina (Wu y Zhong, 1999; Yuan et al., 2001; Dong et al., 1993 y Zhong y Yue, 2005 citados por Zhou y Wu, 2006). Se ha demostrado que la shikonina inhibe la formación del edema auricular inducido con TPA con una dosis inhibitoria media (DI_{50}) de 1.0 mg/oreja (Andújar et al., 2010).

La berberina, un alcaloide de isoquinolina, se emplea para bajar de peso y se ha obtenido por cultivo de células en suspensión de *Coptis japonica* (Fujita y Tabata, 1987; Smetanska, 2008), además ha demostrado actividad antiinflamatoria en modelos biológicos de edema auricular inducido con TPA y subplantar inducido con carragenina (Kuo et al., 2004); adicionalmente, se han reportado sus efectos ansiolítico y antidepresivo en ratas con síndrome de abstinencia (Lee et al., 2012). De cultivos de callos de *Coptis chinensis* se han

aislado berberina y jatrorrizina, esta última también se ha producido en cultivos de células de *Berberis julianae* inmovilizadas con geles de alginato de calcio y con poliuretano reticulado (Zhou y Wu, 2006).

La sanguinarina ha sido producida en cultivos de células de *Papaver somniferum* y tiene mercado potencial en productos de higiene bucal (Park et al., 1990; Rout et al., 2000); además inhibe el efecto de ésteres de forbol sobre la activación del factor de transcripción NF- κ B durante la inflamación (Chaturvedi et al., 1997).

El ácido rosmarínico se ha producido de manera industrial por cultivos celulares de *Coleus blumeii* (Petersen, 2003; Smetanska, 2008); dentro de las actividades biológicas reportadas se encuentra el efecto ansiolítico que ha sido probado en modelos murinos conductuales como el laberinto elevado en cruz (Pereira et al., 2005); además posee actividad antioxidante. Su producción se ha dado también en cultivos de raíces y cultivos celulares transformados por *Agrobacterium rhizogenes* de *Salvia miltiorrhiza*. De estos cultivos se ha aislado también el ácido litospérmico B, que junto con el ácido rosmarínico ha mostrado también diversas actividades farmacológicas como los efectos preventivos de la uremia y la hepatitis, y los efectos vasodilatadores e hipotensores dependientes del endotelio (Chen et al., 1997; Xia et al., 1992 citado por Zhou y Wu, 2006).

Ejemplos de antioxidantes producidos por cultivos de células vegetales son el licopeno, carotenoide producido por un cultivo celular de zanahoria (*Daucus carota*) en un medio suplementado con ANA (Liang et al., 2003 citado por Zhou y Wu, 2006). El α -tocoferol o vitamina E es el antioxidante más conocido y ha sido producido en cultivos celulares de cártamo, *Carthamus tinctorius* (Zhao et al., 2001 citado por Zhou y Wu, 2006).

Se han producido flavonoides e isoflavonoides en cultivos de tejidos de varias plantas medicinales como *Saussurea medusa* (Compositae), *Maackia amurensis* (Leguminosae), *Glycyrrhiza uralensis* (Leguminosae) y *Panax japonicus* var. *major* (Araliaceae) (Zhou et al., 1998 y Luo et al., 2003 citados por Zhou y Wu, 2006 ; Xing et al., 1999;).

Las cuatro principales especies de *Panax* de la familia Araliaceae contienen numerosas saponinas triterpenoides como los ginsenósidos Rb1, Re, R1, Rg1 y Rh1, algunos de los cuales han mostrado un rango de actividades farmacológicas como hemostático, reductor del colesterol e hipolipemiante, etc. Los cultivos celulares de las especies *P. ginseng*, *P.*

notoginseng, *P. quinquefolium* y *P. japonicus* var. *major* han sido establecidos y ampliamente evaluados para la producción de los principales ginsenósidos. Se ha escalado a un biorreactor tipo air-lift un cultivo en suspensión de *P. notoginseng* optimizando el suplemento de nutrientes y las condiciones de cultivo para el crecimiento celular y producción de saponinas (Wu y Zhong 1999; Han y Zhong, 2002; Zhong y Yue, 2005; Zhou y Wu, 2006).

2.4 Efecto del nitrato como fuente de nitrógeno en el metabolismo celular

El nitrógeno es el nutriente más importante para el desarrollo de la planta después del agua dada su abundancia en las biomoléculas. Las formas iónicas preferidas por la planta para su absorción por la raíz son el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+). Existe la posibilidad de absorber nitrógeno atmosférico N_2 por fijación simbiótica en leguminosas y otras familias gracias a microorganismos de géneros como *Rhizobium* y *Frankia*, y por absorción del amoníaco en forma gaseosa a través de las estomas; ambos terminan convirtiéndose en amonio (Bonilla, 2013).

En la planta, el 50% del nitrógeno se distribuye en proteínas y ácidos nucleicos; el resto en forma de N orgánico soluble (aminoácidos, amidas, aminos) y N inorgánico (iones nitrato y amonio principalmente) (Bonilla, 2013).

Los metabolismos del nitrógeno y del carbono están interconectados y se regulan recíprocamente para mantener una proporción interna carbono/nitrógeno (C/N) adecuada. La asimilación del N en las plantas requiere poder reductor, ATP y esqueletos carbonados. El poder reductor puede ser suministrado por reacciones lumínicas de la fotosíntesis o por la glucólisis y la respiración. Los esqueletos carbonados son proporcionados por la oxidación de carbohidratos que son formados por reducción fotosintética del carbono. La asimilación del nitrógeno es, por tanto, un proceso íntimamente conectado al metabolismo del carbono (Maldonado, 2013).

La asimilación del nitrógeno origina un flujo de carbono desde carbohidratos hasta aminoácidos. En ausencia de fotosíntesis, el almidón o la sacarosa pueden suministrar dicho carbono. En la luz, los azúcares que se sintetizan en el ciclo reductor de las pentosas fosfato constituyen la última fuente de esqueletos carbonados para sustentar la síntesis de aminoácidos. En tejidos fotosintéticos, el carbono asimilado se reparte entre la formación de carbohidratos y la síntesis de aminoácidos. El flujo del carbono orgánico hacia una u otra vía se modula a través de la regulación de enzimas clave de ambas rutas, como respuesta a la

luz, y a la disponibilidad de carbono y nitrógeno. Por su importancia metabólica y fisiológica, la glutamina y la asparragina son, probablemente, los dos productos más importantes de la asimilación y reasimilación de nitrógeno en la planta. Ambos aminoácidos constituyen un punto importante de conexión entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Maldonado, 2013).

Del mismo modo que el metabolismo del nitrógeno es regulado por los metabolitos carbonados, la expresión de muchos genes del metabolismo del carbono se regula por compuestos nitrogenados. Así, el nitrato no sólo induce los genes que codifican las enzimas necesarias para su reducción y posterior asimilación, sino que también actúa como señal reguladora positiva de genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos, y como señal negativa de genes requeridos para la biosíntesis de los mismos. De esta forma, el nitrato estimula el flujo de carbono hacia la formación de ácidos orgánicos, los cuales son necesarios para la formación de esqueletos carbonados para la biosíntesis de los aminoácidos. Esta regulación recíproca entre los metabolismos del carbono y del nitrógeno permite a la planta coordinar las velocidades de biosíntesis de carbohidratos y de aminoácidos, con el fin de mantener un adecuado balance interno C/N (Maldonado, 2013).

Una de las modificaciones más útiles realizadas en el medio de cultivo para promover la producción de metabolitos secundarios es la modificación de la relación C/N (Bhojwani y Dantu, 2013). La reducción en la concentración de nitrato estimula el metabolismo de los fenilpropanoides, en lugar de dirigir la ruta biosintética de metabolitos del nitrógeno, y está mediada por la inducción de un conjunto de enzimas en los primeros pasos de la vía biosintética de los fenilpropanoides. En tejidos no fotosintéticos, la descomposición de carbohidratos proporciona equivalentes reductores, ATP y esqueletos de carbono para apoyar la asimilación de nitrógeno inorgánico y la síntesis de metabolitos que contienen nitrógeno, como aminoácidos y nucleótidos. Cuando se cambia el suministro de carbono o nitrógeno, muchos metabolitos centrales en el metabolismo de carbono y nitrógeno cambian en paralelo en lugar de hacerlo de manera antagonista. Cuando la fotosíntesis se inhibe con poca luz, días cortos o inhibición antisentido de la expresión de los genes RBCS que codifican la subunidad menor de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO), los carbohidratos disminuyen, la asimilación de nitratos se inhibe y los niveles de aminoácidos disminuyen. Cuando la fotosíntesis se estimula en plantas en crecimiento, se presenta una elevada concentración de dióxido de carbono [CO₂], hay un aumento en los

niveles de muchos aminoácidos y de carbohidratos (Matt et al., 2001). En las plantas con nitrato limitado, la mayoría de los carbohidratos se acumulan como almidón, y los aminoácidos y azúcares solubles disminuyen.

Estudios moleculares han comenzado a elucidar la compleja red que coordina e integra el metabolismo del nitrato y el carbono (Figura 4). La expresión de cientos de genes se altera al adicionar nitrato a plantas deficientes de nitrógeno (Scheible et al., 2004; Wang et al., 2004; Fritz et al., 2006). Esto incluye la inducción de genes que participan en la absorción y asimilación de nitrato, una importante reprogramación del metabolismo primario del carbono para producir equivalentes reducidos y ácidos orgánicos para la asimilación del nitrógeno y facilitar la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, y la inducción de genes requeridos para la síntesis de proteínas, lípidos y componentes de la pared celular (Fritz et al., 2006).

En experimentos realizados por Fritz et al. (2006) en *Nicotiana tabacum*, se demostró la relación existente entre el metabolismo del nitrato y del carbono con la regulación de la biosíntesis de fenilpropanoides y de compuestos nitrogenados como el alcaloide nicotina. Plántulas deficientes en nitrato acumularon gran cantidad de fenilpropanoides como el ácido clorogénico y flavonoides pero baja concentración de nicotina, además de presentar niveles altos de lignificación. El análisis de la expresión de genes por PCR en tiempo real (QRT-PCR), mostró la inducción de un arreglo de genes involucrados en la activación de la vía de la enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL), clave en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides (Figura 4).

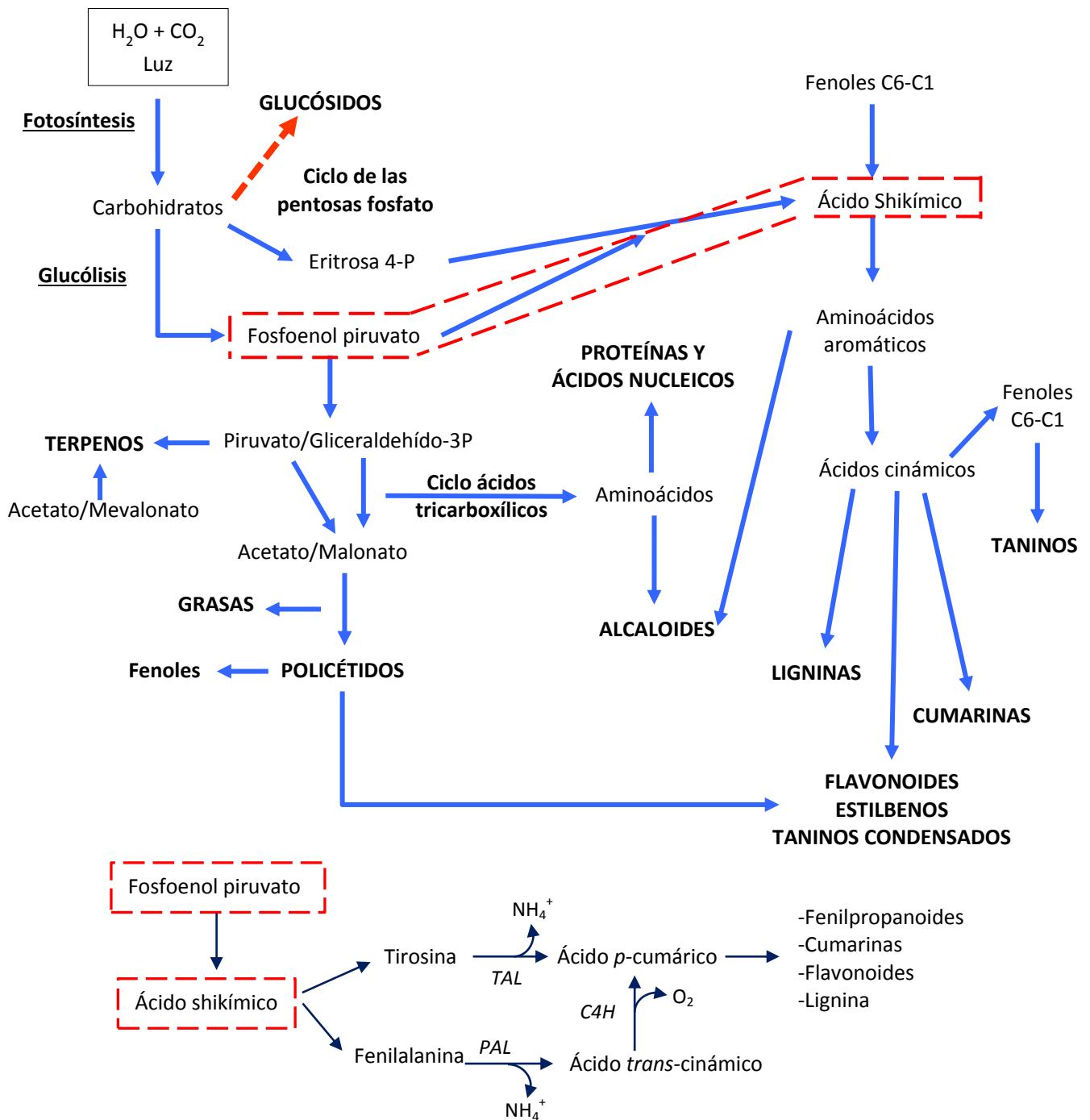


Figura 4. Relaciones entre el metabolismo primario y secundario de las plantas, origen biosintético de los principales grupos de compuestos secundarios y detalle de la Ruta del ácido shikímico. *TAL*: tirosina amonio liasa; *PAL*: fenilalanina amonio liasa; *C4H*: cinamato 4-hidroxilasa. Adaptado de Piñol et al., 2013.

El balance C/N puede utilizarse como una estrategia metabólica orientada a la biosíntesis de compuestos activos de tipo fenilpropanoide, flavonoides y cumarinas y su acumulación en plantas y suspensiones celulares, como se ha reportado en condiciones de restricción de nitratos en *Nicotiana tabacum*, *Cecropia obtusifolia* y *Sphaeralcea angustifolia* para la producción de ácido clorogénico, ácido sphaerálcico, isoorientina y las cumarinas escopoletina y tomentina (Fritz et al., 2006; Mora-Izquierdo et al., 2011; Nicasio-Torres et al., 2012, 2016; Pérez-Hernández et al., 2014, 2019).

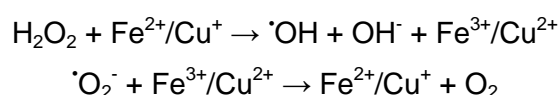
2.5 Efecto del cobre en el metabolismo celular

El cobre es absorbido como catión divalente (Cu^{2+}) en suelos aireados o como ion cuproso (Cu^+) en suelos pobres en oxígeno o con alto contenido de agua. Es un nutriente esencial por estar presente en diversas proteínas y enzimas implicadas en procesos de oxidación/reducción. Dos sistemas clave en dicho proceso son la plastocianina, proteína cloroplástica involucrada en el transporte electrónico de la fotosíntesis entre el fotosistema II y el fotosistema I, y la enzima citocromo c oxidasa, enzima respiratoria que cataliza la transferencia hasta el oxígeno en las crestas mitocondriales. Es también componente del complejo enzimático fenolasa, que oxida fenoles y se relaciona con la síntesis de lignina, ya que forma algunos de sus precursores. En este sentido, entre los primeros signos en deficiencia de Cu se encuentran la reducción en la lignificación y acumulación de fenoles (Bonilla, 2013).

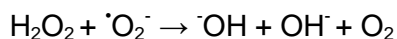
El cobre se clasifica como un metal pesado, junto con el plomo, el cadmio y el zinc, y causan alta toxicidad en las plantas, las cuales producen proteínas de defensa ante la exposición a estos metales. Uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas frente a agentes, en su mayoría tóxicos, son las fitoquelatinas, proteínas de bajo peso molecular con un elevado número de aminoácidos azufrados, principalmente cisteína, que forman complejos con metales pesados como el cobre, el cadmio y el plomo (Bonilla, 2013). Las metalotioneínas se sintetizan enzimáticamente a partir del glutatión, son estas proteínas de bajo peso molecular presentan dominios ricos en cisteína en las regiones amino y carboxilo terminal (Macovei et al., 2010).

En altas concentraciones, el cobre cataliza la formación de EROs como el peróxido, los radicales superóxido e hidroxilo, que pueden inducir estrés oxidante y daño oxidativo considerable en macromoléculas importantes como el ADN, proteínas y lípidos (Maksymiec, 1997; Janas et al., 2009). Por otro lado, las EROs sirven como señal de adaptación a condiciones de estrés por metales pesados. El efecto tóxico del Cu^{2+} resultante del estado oxidante puede ser disipado por varios sistemas antioxidantes incluyendo los sistemas enzimáticos peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa, además de compuestos fenólicos, prolina, tocoferoles y poliaminas (Maksymiec, 2007; Janas et al., 2009). Es posible que los compuestos fenólicos al actuar como reductores puedan secuestrar o quelar metales pesados, disminuyendo así la toxicidad por metales en las células (Janas et al., 2009). En particular, su grupo carboxilo o los grupos hidroxilo pueden unirse fuertemente a Cu^{2+} y Fe^{2+} (Fernandez et al. 2002). Cabe destacar que los compuestos fenólicos (fenilpropanoides como flavonoides y derivados de ácidos hidroxicinámicos), en contraste con su actividad antioxidante, también pueden actuar como pro-oxidantes (Sakihama et al., 2002).

Los metales pesados y herbívoros desencadenan en la planta un sistema de respuesta similar al estrés oxidante inducido por el ataque por patógenos. Las EROs se originan de actividades enzimáticas como NADPH oxidasa (OX) o a través de la reacción de Fenton, que genera radicales hidroxilo y superóxido. Además del ion hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno al reaccionar con los iones metálicos:



La formación del peróxido de hidrógeno y del radical superóxido puede darse a través de la reacción de Haber-Weiss, independiente de la acción de un metal:



Estas EROs oxidan los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la membrana lipídica a hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados (HP-AGPI), en este proceso puede intervenir también la acción enzimática de la lipoxigenasa (LOX). Los HP-AGPI son convertidos a oxilipinas (como el ácido jasmónico o el ácido linoleico) por acción de vías enzimáticas o no enzimáticas. Estas oxilipinas participan de manera inter- y extracelular en

procesos de señalización en respuesta a múltiples reacciones defensivas. Inducen la expresión de genes para la biosíntesis y acumulación de moléculas de defensa como los inhibidores de proteasas, compuestos volátiles y metabolitos secundarios. Este proceso se resume en la Figura 5, aunque se trata de un mecanismo de defensa complejo donde intervienen receptores de señalización mediada por receptores, cambios en la concentración citosólica de calcio y cascadas de fosforilación/desfosforilación de proteínas (Mithöfer et al., 2004).

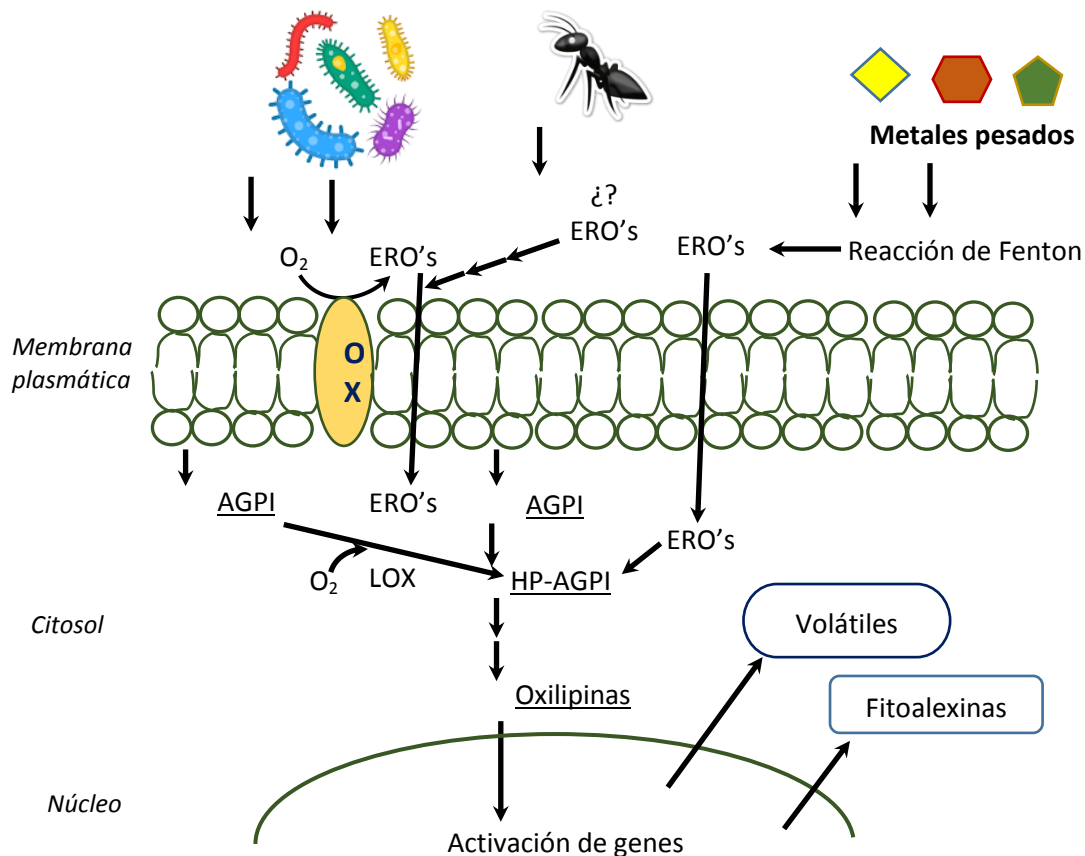


Figura 5. Modelo para inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios por elicitador biológico o con metales pesados. Adaptado de Mithöfer et al., 2004.

Entre los genes activados en esta cascada de señales se encuentran los de la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima clave en el cambio del metabolismo primario al metabolismo secundario como en la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides, enzima que también se activa en condiciones de reducción de nitratos (Fritz et al., 2006). La modificación de las

concentraciones de nitratos totales y de cobre, por sí solos en el medio de cultivo o en combinación, pueden ser explotadas como estrategias de estimulación de la producción de metabolitos secundarios, como ha sucedido en la producción de ácido sphaerálcico y las cumarinas escopoletina y tomentina por cultivos de células en suspensión de *Sphaeralcea angustifolia* a nivel matraz y biorreactor al reducir el contenido de nitratos a 2.74 mM (Pérez-Hernández et al., 2018, 2019). La reducción de 1.5 veces (18.8 mM) del contenido de nitratos en el cultivo de células en suspensión de *Gymnema sylvestre* provocó la caída de la biomasa pero el incremento en la producción de ácido gimnémico (Praveen et al., 2011), mientras que en cultivos celulares de *Cecropia obtusifolia* la reducción del contenido de nitratos a 8 y 16 mM incrementó tres y cuatro veces la producción de ácido clorogénico e isoorientina, respectivamente, además se identificaron los ácidos cafeico y ferúlico (Nicasio-Torres et al., 2012). Por otra parte, la modificación de la relación de las sales de cultivo NH_4NO_3 y KNO_3 expresada como $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ a una relación 60:20 mM incrementó la producción de puerarina, además la modificación del cobre en el medio de cultivo de 0.025 a 0.05 mg L^{-1} Cu^{2+} incrementó 2.2 veces la concentración de puerarina aunque se redujo la biomasa celular del cultivo en suspensión (Karwasara y Dixit, 2011).

2.6 Diseño Experimental: Metodología de Superficie de Respuesta

El diseño experimental permite conocer estadísticamente las relaciones entre la entrada y salida de variables en sistemas y procesos de producción donde ocurren transformaciones físicas, químicas o biológicas. Dicho diseño permite analizar qué variables independientes afectan el resultado experimental y de qué manera. Los bioprocesos que demandan medios de cultivo complejos pueden beneficiarse del diseño de experimentos para evitar sesgos experimentales y reducir significativamente la cantidad requerida de experimentos para llegar a una operación óptima. Por tanto, es necesario conducir experimentos de barrido o detección de factores (variables experimentales independientes) importantes que afectan el resultado experimental, para poder analizar dicho efecto mediante una superficie de respuesta (Van Ryswyk y Van Hecke, 1991; Hanchinal et al., 2008; Mandenius, 2016).

Para maximizar, por ejemplo, el rendimiento de un producto en el menor tiempo posible utilizando cantidades mínimas de reactivos, se puede evaluar el efecto de la temperatura, presión, relaciones en la concentración de reactivos, tiempo de reacción y catalizadores,

para determinar cuáles son los factores que tienen el mayor efecto en la síntesis del producto a lo largo del cultivo. Si no se sabe *a priori* qué factores tienen el mayor efecto en el resultado, se pueden realizar inicialmente experimentos de detección de estos factores, llamados diseños factoriales fraccionales de Plackett-Burman o Yates, para determinar los factores cuyo efecto resulta más significativo (Van Ryswyk y Van Hecke, 1991).

Una superficie de respuesta es un gráfico del sistema que muestra cómo varía la respuesta frente a los diferentes valores que puede tomar cada uno de los factores o variables que se involucran en el estudio (Palasota y Deming, 1992). Los métodos de superficie de respuesta (MSR) proporcionan un proceso sistemático de optimización que requiere un esfuerzo menor comparado con los métodos tradicionales, donde se varía sistemáticamente un factor a la vez, manteniendo constantes todos los demás. Aunque completo, el enfoque uno a la vez tiene dos inconvenientes principales: el tiempo o costo requerido para su desarrollo lo hace impráctico; además, si existe una interacción entre dos o más variables importantes cuyo efecto resulte significativo sobre la variable respuesta, estos efectos son muy difíciles de establecer bajo esta modalidad. Con base en lo anterior, se opta por las MSR como una alternativa que soluciona las limitantes de la metodología un factor a la vez, sin requerir una mayor inversión de tiempo y recursos, y que permite obtener más información del sistema en su exploración (Van Ryswyk y Van Hecke, 1991; Mandenius, 2016).

El objetivo de la metodología de superficie de respuesta es describir el comportamiento del sistema ante la variación de los factores, desarrollando el mínimo posible de experimentos. Se elige un rango de valores que abarque el punto de inflexión, donde se obtiene la máxima respuesta dentro del intervalo en el que se prueban los factores experimentales. En este caso, el número de experimentos debe ser adecuado para estimar o predecir el valor de la variable. Además, si las circunstancias lo permiten, debe haber repeticiones para probar la consistencia experimental. Los valores que toma cada factor dentro del intervalo deseado para cada variable se deben codificar, lo que favorece el análisis estadístico del experimento. Para codificar, es necesario establecer el nivel bajo de cada variable en -1, el nivel alto en +1 y el nivel inicial en 0 (Van Ryswyk y Van Hecke, 1991; Palasota y Deming, 1992; Mandenius, 2016).

La MSR se fundamenta en los siguientes conceptos (Van Ryswyk y Van Hecke, 1991):

1. El diseño experimental determina el número de experimentos y el intervalo de valores que tomarán las variables experimentales.
2. Los resultados obtenidos al desarrollar el diseño experimental permiten obtener una ecuación de predicción, que permite describir la superficie de respuesta bajo las condiciones experimentales empleadas.
3. El análisis canónico ejecutado al modelo matemático permite encontrar las condiciones experimentales en las que se obtiene la mayor respuesta.

La ecuación de predicción obtenida con el análisis cinético efectuado a los resultados del diseño experimental, es un modelo empírico polinómico completo de segundo orden. A menudo es adecuado para describir una amplia variedad de sistemas químicos multifactoriales, y se define como:

$$Y_{1i} = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} + \beta_{11}(X_{1i})^2 + \beta_{22}(X_{2i})^2 + \beta_{12}(X_{1i}X_{2i})^2 + r_{1i}$$

Donde Y_{1i} es la respuesta única en el i -ésimo experimento (p. ej., absorbancia); X_1 y X_2 son los factores o variables experimentales; β_0 es el término de intercepción, el valor original de la respuesta; β_1 y β_2 indican el efecto que ejercen las variables sobre la respuesta; β_{11} y β_{22} significan el efecto que tienen los factores en la curvatura de la superficie; y β_{12} es el término de interacción, que es una medida de cuánto cambia la pendiente, con respecto a un factor, a medida que el otro factor aumenta o disminuye. El modelo polinómico completo de segundo orden generalmente proporciona una buena aproximación del comportamiento real de un sistema dado sobre un factor de dominio modesto (Palasota y Deming, 1992).

Diseño Compuesto Central (DCC).

Suponiendo que el modelo de la ecuación anterior describirá adecuadamente el comportamiento de un sistema de dos factores, es necesario elegir un diseño experimental que proporcione datos suficientes para estimar el valor de los coeficientes β . Box y Wilson introdujeron en 1951 el diseño compuesto central, que consta de un Diseño Factorial completo de dos niveles (cuadrado) superpuesto en un diseño de estrella (puntos), en donde los centros de los dos diseños coinciden. Este diseño permite la estimación de un intercepto, pendiente, curvatura e interacción entre factores en el modelo de la ecuación anteriormente descrita. El DCC sigue siendo el diseño experimental simétrico de segundo orden más utilizado para el desarrollo de procedimientos analíticos. La aplicación del diseño factorial de

tres niveles no es frecuente, y el uso de este diseño se ha limitado a la optimización de dos variables, porque la eficiencia es muy baja para un mayor número de variables (Palasota y Deming, 1992; Gilmour, 2006; Bezerra et al., 2008; Hanchinal et al., 2008).

En este estudio se empleará la MSR como una estrategia de diseño experimental para estimular la producción de los compuestos escopoletina (antiinflamatorio) y 3-O- β -D-glucósido de quercetina (ansiolítico), tomando en consideración las concentraciones basales del medio de cultivo MS de 27.4 mM de nitratos totales (X_1) y 0.1 μ M de cobre (X_2) como variables independientes establecidas en sus niveles centrales (0,0), a partir de los cuales se planteará un diseño factorial 2^k (DF 2^k) para conocer el efecto de las variables independientes y la significancia de su interacción en la producción de biomasa (Y_1), y los compuestos activos escopoletina (Y_2) y 3-O- β -D-glucósido de quercetina (Y_3). A partir de este diseño se establecerá un DCC si existe significancia en la interacción entre las variables independientes, se plantearán los modelos matemáticos y sus respectivas superficies de respuesta con las condiciones óptimas predichas para la producción de activos y biomasa celular.

2.7 Úlcera péptica

La úlcera péptica es un defecto de la mucosa gastrointestinal que se extiende a través de la *muscularis mucosae* como consecuencia de la actividad de la secreción ácida del jugo gástrico. La prevalencia de la úlcera péptica se estima entre el 5% y el 10% de la población general (esta cifra asciende al 10%-20% si se consideran los individuos infectados por *Helicobacter pylori*). La incidencia de úlceras oscila entre el 0.1% y el 0.3% anual, pero llega hasta el 1% entre las personas *H. pylori* positivas, lo que representa una tasa de 6 a 10 veces más elevada que la descrita en los individuos no infectados. En la actualidad, la incidencia anual de la úlcera gástrica oscila entre 0.3 y 0.4 por cada 1000 habitantes (Borstnar y Cardellach, 2014).

La lesión ulcerosa consiste en una pérdida de sustancia localizada de la mucosa y, en grado variable, de las restantes capas de la pared gástrica o duodenal. La úlcera gástrica suele ser única, redondeada u oval, aunque puede ser lineal y su diámetro es en general menor de 3 cm. Puede aparecer en cualquier porción del estómago, pero en más de la mitad de los

casos se localiza a lo largo de la curvatura menor, cerca de la incisura angular, en la unión del cuerpo con el antro gástrico (Figura 6).

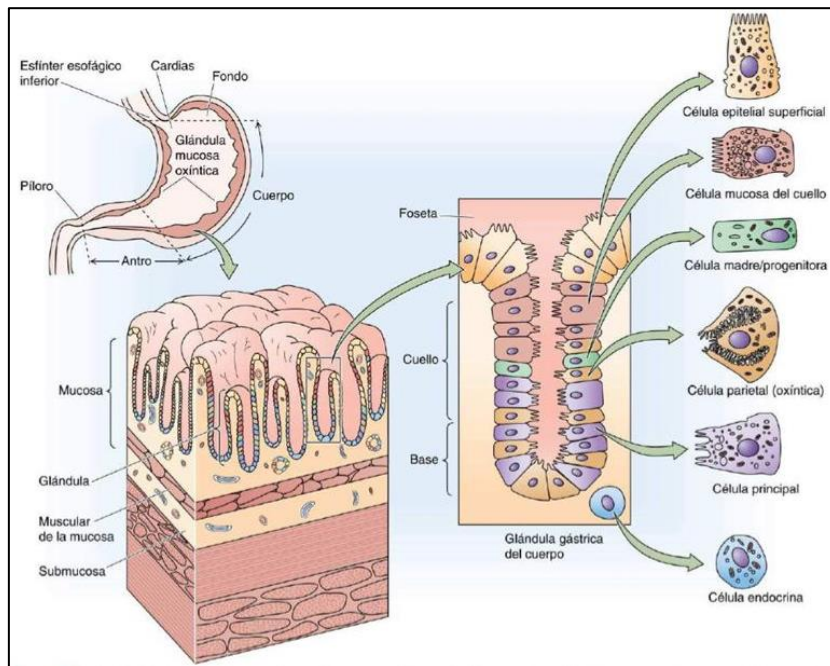


Figura 6. Anatomía del estómago. Sección transversal de la pared del estómago. Adaptado de Boron y Boulpaep (2017).

Histológicamente, las lesiones de la mucosa gastroduodenal se clasifican en:

Erosiones. Son lesiones superficiales y redondeadas, de menos de 5 mm de diámetro, márgenes poco sobreelevados, fondo pardo o enrojecido y, por lo general, múltiples. Histológicamente, la pérdida de sustancia se limita a la mucosa, donde se observan restos necróticos, fibrina, neutrófilos y eritrocitos con un infiltrado por polimorfonucleares en la periferia. Por lo común, estas erosiones se curan totalmente sin dejar cicatriz (Borstnar y Cardellach, 2014).

Úlcera aguda. Las úlceras agudas son lesiones únicas o múltiples de aspecto similar pero de mayor tamaño que las erosiones. Histológicamente son más profundas y se extienden al

menos hasta la *Muscularis mucosae*. En el fondo de la úlcera puede observarse tejido de granulación con escasa reacción fibroblástica. Los epitelios de revestimiento y glandular periférico muestran un aspecto activo debido a que a partir de ellos se produce la regeneración (Borstnar y Cardellach, 2014).

Úlcera crónica. El criterio de cronicidad de la úlcera péptica se define por la existencia de fibrosis en su base que determinará la cicatrización de la zona. Histológicamente penetra en la mucosa, la submucosa y, por lo general, en mayor o menor grado en la capa muscular. Presenta cuatro capas muy características que, del interior al exterior, son: una capa superficial de exudado fibrinoleucocitario; una capa de tejido necrótico eosinófilo; tejido de granulación muy vascularizado con fibroblastos y abundantes células inflamatorias linfoplasmocitarias y polimorfonucleares y, por último, una capa de fibrosis de grosor muy variable que con frecuencia contiene arterias de distinto diámetro con material trombótico organizado. La mayoría de las úlceras pépticas se asocian a gastritis crónica por *H. pylori*, lo que no ocurre en las úlceras agudas ni en las úlceras crónicas causadas por AINEs o por los estados hipersecretorios (Borstnar y Cardellach, 2014).

La úlcera péptica se genera a consecuencia de un desequilibrio entre los factores agresivos y defensivos que regulan la función de la mucosa gástrica. Entre los primeros, la hipersecreción de ácido, gastrina y pepsinógeno se ha considerado clásicamente como el trastorno fisiopatológico fundamental de los pacientes con úlcera duodenal. La importancia de la secreción ácida y de la actividad péptica del jugo gástrico en la patogenia de la úlcera péptica es evidente, porque en ausencia de ácido no existe úlcera. Asimismo, existe una estrecha correlación entre la eficacia del tratamiento antisecretores (en cuanto a la cicatrización de la úlcera) y la supresión de la acidez gástrica. La infección por *H. pylori* se asocia de forma prácticamente constante con la úlcera duodenal, lo que sugiere que las anomalías descritas en la secreción gástrica son secundarias. Actualmente se reconocen cuatro causas fundamentales de la enfermedad ulcerosa: infección por *H. pylori*, consumo de AINEs, enfermedades propias de la mucosa e hipersecreción gástrica (Borstnar y Cardellach, 2014).

Los AINEs se asocian con el desarrollo de úlcera péptica como un efecto secundario importante, ya que causa la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2) y la producción de prostaglandinas (PG). Además, interfiere con otros factores protectores,

como la proliferación de la mucosa, la secreción de bicarbonato y la regulación del flujo sanguíneo en la mucosa. La ciclooxigenasa es una enzima bifuncional que primero oxida el ácido araquidónico (AA) para producir prostaglandina G_2 (PGG_2) mediante su actividad ciclooxigenasa y después peroxida este compuesto para producir PGH_2 . Los sitios de las dos actividades enzimáticas ciclooxigenasa y peroxidasa están adyacentes, pero son espacialmente distintos. La aspirina (ácido acetilsalicílico) acetila un residuo serina de la COX-1 y la inhibe irreversiblemente. Otros AINEs interactúan a través de sus grupos carboxilo con otros aminoácidos en la misma región. La activación de la COX-1 (enzima constitutiva) desempeña un papel importante en la trombosis intravascular porque estimula la síntesis de tromboxano A_2 (TXA_2) por las plaquetas. La inhibición de este proceso por dosis bajas de aspirina es fundamental para la prevención de la trombosis coronaria en pacientes con enfermedad coronaria aterosclerótica. Sin embargo, la activación de la COX-1 también es importante para producir los prostanoídes citoprotectores PGE_2 (una prostaglandina) y PGI_2 (una prostaciclina) en la mucosa gástrica. La pérdida de estos compuestos puede producir el efecto secundario no deseado de hemorragia digestiva después de tomar aspirina a largo plazo (Borstnar y Cardellach, 2014).

Los estímulos inflamatorios inducen la COX-2 (enzima inducible) en varios tipos celulares, y la inhibición de la COX-2 es la causa de las acciones antiinflamatorias de las dosis altas de aspirina (un inhibidor débil de la COX-2) y de otros inhibidores no selectivos de la ciclooxigenasa como el ibuprofeno. Dado que las dos enzimas solo tienen un 60% de homología, nuevos compuestos que inhiben específicamente la COX-2, como el celecoxib han salido al mercado. Los inhibidores de la COX-2 son buenos agentes antiinflamatorios y tienen pocas probabilidades de causar hemorragia digestiva porque no inhiben la producción de prostaciclina dependiente de la COX-1 (Borstnar y Cardellach, 2014).

2.7.1 Modelos *in vivo* para inducir úlceras gástricas

Existen diversos modelos experimentales en los cuales se simulan las condiciones a las que podrían estar expuestas los seres humanos, y en consecuencia desarrollar las úlceras gástricas (Amaral et al., 2013). El modelo de ligamiento del píloro produce isquemia (hipoxia), generación de elevados niveles de EROs y acumulación de jugo gástrico y pepsina, factores que conllevan a la producción de úlceras gástricas (Shay et al., 1954).

Otro modelo utilizado es la inducción de úlceras por estrés causado por inmersión en agua fría, la producción de lesiones se debe a la reducción de la producción de moco gástrico y es el método más apropiado para analizar los bloqueadores H_2 (Takagi y Okabe, 1968). De manera similar al método anterior, se pueden producir úlceras por la administración de ácido acético, este modelo permite conocer la manera en que este ácido afecta la secreción gástrica y la producción de moco. A través de una incisión en el área abdominal se expone el estómago de la rata y se le inyecta ácido acético al 20% en la capa de la submucosa entre la unión del *fundus* con el *antrum* (Morimoto et al., 1991).

El daño gástrico inducido por los AINEs se debe principalmente a la infiltración de neutrófilos mediada por radicales libres de oxígeno que son formados por el sistema hipoxantina-xantina oxidasa. La indometacina también conduce al agotamiento de glutatión y a la inhibición de la glutatión peroxidasa, lo que al final conduce a la acumulación de peróxidos lipídicos y peróxidos de hidrógeno en las células de la mucosa (Yoshikawa et al., 1997). La administración oral de indometacina causa ulceración debido a la inhibición de la producción de prostaglandina que conduce a la disminución de factores protectores, como son el flujo sanguíneo de la mucosa y la producción de moco (Yuan et al., 2006). Además, los AINEs modulan el factor de crecimiento angiogénico, inhiben la angiogénesis y aumentan la apoptosis de las células endoteliales (Chatterjee y Bandyopadhyay, 2014).

Las úlceras gástricas inducidas con etanol y etanol/HCl son los modelos experimentales más utilizados para la evaluación de la actividad antiulcerogénica (Morimoto et al., 1991). La aplicación intragástrica de etanol daña al endotelio, provoca hipoxia y sobreproducción de EROs, o directamente sobre el endotelio disminuyendo la proliferación celular y una respuesta inflamatoria exacerbada (Amaral et al., 2013).

La generación de lesiones gástricas inducidas por etanol es de origen multifactorial con disminución en la cantidad de moco gástrico (Al-Harbi et al., 1997). En este modelo se observa la constricción de las vénulas submucosas, lo cual provoca la estasis del flujo sanguíneo y posteriormente causa una fuga de plasma del lecho vascular, generando la lesión de la mucosa gástrica. Otro factor clave es la secreción de ácido gástrico, su alta acidez puede empeorar el daño existente o potenciar la acción de un agente agresivo sobre la mucosa gástrica (Savegnago et al., 2006; Amaral et al., 2013); además de provocar el agotamiento de los mecanismos de defensa gástrica, la producción de moco y la secreción de bicarbonato (Kinoshita et al., 1995). La producción de EROs y la reducción concomitante

de la capacidad antioxidante son responsables del daño y la muerte debido a su extrema reactividad; atacan los constituyentes celulares esenciales como las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos, y con ello la formación de compuestos tóxicos (Kahraman et al., 2003; Amaral et al., 2013).

2.7.2 Compuestos antiulcerogénicos en extractos de plantas

Distintos extractos de plantas han sido reportados con actividad antiulcerogénica, en los cuales se han identificado compuestos de naturaleza fenólica. Del extracto metanólico de *Gardenia jasmonoides* se han aislado los glicósidos iridoides gardenósido y genipin-1- β -gentibiósido, compuestos a los que se les atribuyó actividad gastroprotectora en un modelo de úlceras inducidas con etanol/HCl (Chen et al., 2017). El extracto hidroalcohólico (etanol al 70%) de *Scutia buxifolia* se evaluó en un modelo de úlceras generadas por etanol al 70%, su actividad fue atribuida a los compuestos ácido cafeico, ácido gálico, ácido clorogénico, quercetina, rutina y kaempferol (Boligon et al., 2014). Así mismo, el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* demostró acción protectora en modelos de úlceras gástricas inducidas con etanol al 70%, además de presentar efecto antioxidante, vasodilatador y antiinflamatorio. La actividad gastroprotectora se atribuye al contenido de los ácidos carnósico y rosmarínico identificados en el extracto (Dias et al., 2000; Altinier et al., 2007; Erkan et al., 2008; Amaral et al., 2013). La reducción del daño causado por el etanol podría deberse a la actividad antioxidante y antiinflamatoria del ácido rosmarínico (Petersen y Simmonds, 2002).

Del extracto etanólico de *Baccaris tandilensis* se aislaron e identificaron flavonoides como la apigenina, sakuranetina y los derivados de dimetiléter de naringenina, kaempferol y apigenina, además de espatulenol, bacotricuneatina B, ácido oleanólico y escopoletina, compuestos a los cuales les fue atribuida actividad gastroprotectora en un modelo de úlceras inducidas con etanol absoluto (Vidari et al., 2003). Los flavonoides son compuestos ampliamente estudiados por presentar diversas actividades biológicas como la antioxidante y la gastroprotectora en diversos modelos de úlceras, al presentar además de efecto antisecretor y actividad citoprotectora. De Lira-Mota et al. (2009) enlistan aproximadamente 95 compuestos de naturaleza flavonoide cuyas actividades antiulcerogénica y gastroprotectora han sido validadas. Se han reportado chalconas, como la 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona y la 2',3,4-trihidroxichalcona; flavanonas como la hesperidina y la naringina; y flavanos y flavanoles como la catequina y epicatequina; flavanololes como la taxifolina; antocianidinas como el cloruro de benzopirillium; isoflavanos como la genistina; flavonoles

como el kaempferol, la miricetina o quercetina; biflavonoides como las cinamtaninas B-1 y D-1 o las procianidinas B-1 a B-4. Las flavonas son los flavonoides con actividad antiulcerogénica más amplia, se reportan hiperósido, apigenina, rutina, quercitrina, luteolina, escoparina, entre otros.

Mención aparte merecen las cumarinas, pues además de presentar actividad antioxidante importante actúan en la inhibición de moléculas derivadas del metabolismo del ácido araquidónico, inhiben a las enzimas que participan en la respuesta inflamatoria como la COX y la lipoxigenasa (LOX). Dentro de las cumarinas reportadas se encuentran la esculetina, herniarina, escopoletina, fraxetina, escoparona, esculina, bergaptol, cnidilina, entre otras (Fylaktakidou et al., 2004).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios científicos sustentan la efectividad ansiolítica, sedante y antidepresiva de los extractos de inflorescencias, brácteas y hojas de *T. americana* var. *mexicana*; asimismo, se han aislado e identificado sus principales compuestos químicos activos, glicósidos derivados de los flavonoides kaempferol y quercetina como el tilirósido. También se reporta el uso medicinal de esta especie para aliviar padecimientos y síntomas asociados a la inflamación; no obstante, solo se ha demostrado que la infusión de inflorescencias posee actividad analgésica. Estos antecedentes integran la plataforma científica que sustenta las potencialidades de la especie para el desarrollo de un fitofármaco, el cual podría ser evaluado en su eficacia y seguridad en el humano para el tratamiento de padecimientos relacionados con la ansiedad y/o inflamatorios como las úlceras gástricas. La úlcera gastroduodenal es una de las patologías más comunes en el hombre y puede derivar en cáncer si no es tratada adecuadamente. Las causas que las generan son diversas y representan factores de riesgo para desarrollarla, entre ellas, beber alcohol, fumar, tener estrés, padecer infecciones por la bacteria *H. pylori*, o consumir medicamentos AINEs, estos últimos afectan directamente la producción de moco que protege el tubo digestivo y aumenta la producción de ácido. Debido a las complicaciones que genera la ingesta de estos medicamentos es necesario buscar fitofármacos que reduzcan estas lesiones gastrointestinales.

Una de las herramientas biotecnológicas que permite la producción sustentable de compuestos de interés farmacológico es el cultivo de células en suspensión, sistema que ha demostrado tener un gran potencial y es utilizado ampliamente a nivel industrial. Con el propósito de contar con un sistema alternativo para la producción de compuestos bioactivos de *T. americana* var. *mexicana* en condiciones controladas de crecimiento, se plantea establecer, suspensiones celulares cultivadas en lote en matraces agitados. Posteriormente, se propone definir las concentraciones recomendables de los estimuladores abióticos nitratos y cobre en el medio de cultivo de Murashige y Skoog, que favorezcan la producción de los compuestos con actividad ansiolítica (3-O- β -D-glucósido de quercetina) y/o antiinflamatoria (escopoletina) empleando la MSR. Otro aspecto por abordar es la evaluación del extracto metanólico de la suspensión celular de *T. americana* var. *mexicana* en el modelo murino de úlceras gástricas inducidas por etanol absoluto, apoyado en el uso de la planta en padecimientos con trasfondo inflamatorio.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las bondades de *T. americana* var. *mexicana* se ven comprometidas por la calificación emitida por la SEMARNAT (NOM-059-SEMARNAT-2010) como una especie en “peligro de extinción”, por lo cual ha sido necesario buscar y aplicar una estrategia experimental de cultivo que nos permita obtener material vegetal para validar sus propiedades medicinales. Dentro de la biotecnología vegetal, los cultivos de callos y células en suspensión son una alternativa factible para obtener material vegetal controlado y de calidad de esta especie. Empleando estas técnicas se estableció un diseño experimental que permitió optimizar el crecimiento de la suspensión celular, así como estimular la producción de los compuestos escopoletina (antiinflamatorio) y 3-O- β -D-glucósido de quercetina (ansiolítico) en las suspensiones celulares. Estas técnicas de estimulación abiótica, modificando las concentraciones de nitrato y cobre en el medio de cultivo de Murashige y Skoog empleando la MSR, se emplearon como estrategia para incrementar la producción de compuestos fenólicos. Paralelamente, se evaluó la actividad gastroprotectora del extracto metanólico del cultivo de células en suspensión, apoyado en su uso tradicional para aliviar padecimientos y síntomas asociados a la inflamación la cual hasta ahora no se había reportado para la especie.

V. HIPÓTESIS

1. El estrés abiótico producido en el cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* por el exceso del cobre y restricción de nitratos en el medio de cultivo MS, estimulará la producción de los compuestos antiinflamatorios y/o ansiolíticos.
2. El extracto metanólico del cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* productor del antiinflamatorio escopoletina, mostrará un efecto gastroprotector en el modelo murino de úlceras inducidas con etanol.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivos Generales

- ✓ Establecer los niveles de nitrato total y cobre óptimos aplicando la MSR, para incrementar la producción de los compuestos con actividad antiinflamatoria y/o ansiolítica en el cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* en matraces agitados.
- ✓ Evaluar el efecto gastroprotector del extracto metanólico y fracciones ricas en compuestos fenólicos obtenidos del cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*, en un modelo murino de úlceras gástricas inducidas con etanol absoluto.

6.2 Objetivos Particulares

- ✓ Caracterizar la cinética de crecimiento de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*, cultivadas en lote en matraces agitados con medio de cultivo MS.
- ✓ Determinar la cinética de producción de compuestos con actividad antiinflamatoria (escopoletina) y/o ansiolítica (3-O- β -D-glucósido de quercetina), en cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* en medio de cultivo MS.
- ✓ Definir los niveles de nitratos y cobre recomendables, aplicando la MSR, para optimizar el crecimiento de la suspensión celular en lote de *T. americana* var. *mexicana*.
- ✓ Establecer los niveles de nitratos y cobre óptimos aplicando la MSR, para incrementar la producción de escopoletina y/o 3-O- β -D-glucósido de quercetina en el cultivo tipo lote de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*.
- ✓ Caracterizar las cinéticas de crecimiento y producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina, en cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* en medio MS con contenidos de nitratos y cobre determinados como óptimos por la MSR.
- ✓ Obtener las fracciones ricas en compuestos fenólicos del extracto metanólico del cultivo de células en suspensión por fraccionamiento cromatográfico en columna abierta

- ✓ Evaluar el efecto gastroprotector del extracto metanólico del cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*, en un modelo murino de úlceras gástricas inducidas con etanol absoluto.
- ✓ Determinar el efecto gastroprotector de las fracciones ricas en compuestos de naturaleza cumarínica en el modelo murino de úlceras gástricas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cultivos *in vitro* de *Tilia americana* var. *mexicana*

7.1.1 Cultivo de callos

Se utilizaron callos friables de *Tilia americana* var. *mexicana* previamente desarrollados a partir de explantes de hoja de ramas colectadas en Mexicapan, Estado de México. La especie fue autenticada por la M. en C. Abigail Aguilar, responsable del Herbario de plantas medicinales del IMSS en la Ciudad de México [IMSSM], los ejemplares fueron almacenados con número de referencia IMSSM–5099.

Los callos se desarrollaron en medio de cultivo de MS (1962) completo en sales, suplementado con 30.0 g L⁻¹ de sacarosa, 2.0 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0.5 mg L⁻¹ de KIN, ajustado a pH 5.7, con 3.0 g L⁻¹ de PhytaGel (Sigma-Aldrich, México) como agente gelificante y 1.0 mg L⁻¹ de polivinilpolipirrolidona (PVPP). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 1.2 kg cm⁻² y 121 °C durante 18 min. Los callos se incubaron a 26 ± 2 °C en fotoperiodo de luz: oscuridad (16 h: 8 h) bajo lámparas fluorescentes de luz blanca de una intensidad luminosa de 50 μmol m⁻²s⁻¹ y una humedad relativa de 60%. Los callos fueron transferidos a medio fresco cada cuatro semanas (Gutiérrez-Almanza, 2015).

7.1.2 Cultivo de células en suspensión

El cultivo de células en suspensión en lote se estableció en matraces Erlenmeyer de 250 mL, se utilizó un inóculo del 6% de biomasa fresca de callo friable de 31 meses de edad en 80 mL de medio de cultivo MS completo en sales (27.4 mM de nitratos totales y 0.1 μM de cobre) suplementado con 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D, 0.5 mg L⁻¹ KIN, 30.0 g L⁻¹ de sacarosa, y agua de coco al 5% a pH 5.7. Los cultivos se incubaron en una agitadora orbital (New Brunswick Scientific Co.) a 110 rpm bajo las mismas condiciones de luz y temperatura empleadas para el cultivo de callos. Para su proliferación y mantenimiento, la suspensión celular se transfirió

bajo condiciones estériles a medio nuevo cada 14 días conservando el mismo inóculo. La viabilidad celular se determinó considerando la integridad de la membrana celular medida por el método del azul de Evans. A 1 mL de muestras de la suspensión celular se les agregó una gota del colorante de exclusión azul de Evans al 0.25% (P/V) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 min. Las muestras se observaron microscópicamente (microscopio óptico Olympus CX31, Olympus corporation, Tokyo, Japan) y la magnificación de las imágenes se realizó con el objetivo 10X. Se contaron tres campos de la muestra y el porcentaje de viabilidad se determinó como:

$$\% \text{ viabilidad} = \left(\frac{\text{células no teñidas}}{\text{células totales}} \right) * 100$$

Donde el número de células no teñidas es el número de células vivas en cada campo y el número de células totales es la suma de células vivas no teñidas más muertas teñidas, y multiplicando el cociente por cien (Orozco-Sánchez et al., 2011).

7.2 Cinéticas de crecimiento del cultivo de células en suspensión

Las cinéticas de las células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* en lotes fueron desarrolladas después de 5 subcultivos, las cinéticas se desarrollaron en un periodo de 28 días, durante los cuales 9 matraces fueron cosechados al inicio del estudio (día 0) y en los días lunes, miércoles y viernes para evaluar el crecimiento celular hasta el final del periodo de cultivo. Cada matraz se filtró por separado al vacío utilizando un embudo Büchner (papel filtro Watman No.1, 5.5 cm diámetro), la biomasa retenida se lavó con agua destilada para eliminar los residuos del medio de cultivo y se registró el peso fresco. La biomasa obtenida se secó en un horno (Thelco 160 DM) a 65 °C y después de 48 h se registró el PS (Pérez-Hernández et al., 2014; Nicasio-Torres et al., 2016).

7.2.1 Crecimiento celular

La cinética de crecimiento del cultivo en suspensión fue creada registrando la media de los pesos secos de las biomásas celulares (g L^{-1}) a lo largo del periodo de cultivo. El PS de la $B_{\text{máx}}$ desarrollada al final de la fase logarítmica de crecimiento, y el tiempo de cultivo en que se obtuvo la misma, fueron registrados. El I_c fue calculado considerando la $B_{\text{máx}}$ menos el inóculo (B_0) y dividida entre el inóculo de acuerdo con la ecuación $I_c = \frac{B_{\text{máx}} - B_0}{B_0}$. La $\mu_{\text{máx}}$ se calculó por la ecuación de regresión lineal, generada al graficar en semilog los datos de biomasa obtenidos durante la fase de crecimiento exponencial contra el tiempo; y el t_d se

calculó con la ecuación $t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}$ El rendimiento se calculó con base al rendimiento teórico reportado para carbohidratos en plantas ($Y = 0.5 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}_{\text{sacarosa}}^{-1}$) dividiendo el PS de la B_{\max} obtenida entre el contenido de sacarosa (30.0 g L^{-1}) (Kato y Yoshida, 2009).

Los parámetros cinéticos obtenidos se compararon por un ANOVA y los factores cuyos valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados significativos sobre la respuesta. Diferencias significativas entre las medias de los tratamientos fueron calculadas por la prueba de Tukey_{0.05} (SAS 9.1, SAS Institute, Inc.).

7.2.2 Extracción de células en suspensión

La biomasa seca de células en suspensión (200 mg) de cada matraz obtenidas al tiempo inicial de cultivo (día 0) y después a los 7, 14, 21 y 28 días del cultivo en suspensión en lote, se extrajeron por maceración a temperatura ambiente con metanol en proporción 1:20 (P/V) repitiendo el proceso tres veces (24 h para cada procedimiento). Los extractos obtenidos para cada muestra se aclararon a través de un papel filtro Watman No.1, reunieron y concentraron hasta sequedad (Pérez-Hernández et al., 2014; Nicasio-Torres et al., 2016; Flores-Sánchez et al., 2019); los residuos fueron disueltos en metanol de alta pureza (Merck, México) a una concentración de 10 mg mL^{-1} para su análisis cromatográfico por CLAR. La identificación de escopoletina (99%, Sigma-Aldrich) y 3-O- β -D-glucósido de quercetina (90%, Sigma-Aldrich) en los extractos metanólicos, se realizó comparando sus tiempos de retención (11.2 min y 9.54 min, respectivamente) y sus espectros de absorción ($\lambda_{\max} = 343$ y $\lambda_{\max} = 355 \text{ nm}$, respectivamente). El contenido de ambos compuestos se determinó por el método del estándar externo empleando las ecuaciones de regresión lineal obtenidas con las curvas de calibración de los estándares: 2.5 a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para escopoletina y de 1.25 a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 3-O- β -D-glucósido de quercetina (Flores-Sánchez et al., 2019). Las cinéticas de producción se obtuvieron con los contenidos de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina ($\mu\text{g L}^{-1}$) determinados en las biomásas de esos cultivos en suspensión en lote.

7.2.3 Condiciones de CLAR para análisis de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un equipo de CLAR Waters (módulo de separación 2695) acoplado a un detector de arreglo de diodos (2996) con un rango de detección de 190–600 nm, operado por el sistema Manager Millenium Software System

(Empower ver.1; Waters Corp., Boston, MA; USA). La separación de los compuestos en los extractos metanólicos, para cuantificar escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina, se llevó a cabo utilizando una columna Spherisorb[®] RP-18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m, Waters) empleando una temperatura constante de 25 °C durante los análisis. Las muestras (20 μ L) fueron eluidas a un flujo de 1.0 mL min⁻¹ con un gradiente de fases móviles de (A) agua de alta pureza con 0.5% v/v de TFA (Sigma-Aldrich, México) y (D) acetonitrilo de alta pureza (Merck) (Tabla 1) (Pérez-Hernández et al., 2014; Nicasio-Torres et al., 2016; Flores-Sánchez et al., 2019).

Tabla 1. Método cromatográfico para la separación de compuestos fenólicos escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina.

Tiempo (min)	Flujo (mL min ⁻¹)	%A (TFA 0.5%)	%D (CH ₃ CN)
0	1.0	100	0
1	1.0	100	0
2	1.0	95	5
3	1.0	95	5
4	1.0	70	30
15	1.0	70	30
16	1.0	50	50
18	1.0	50	50
19	1.0	20	80
20	1.0	0	100
21	1.0	0	100
22	1.0	100	0
25	1.0	100	0

7.3 Efecto del nitrato y cobre en el crecimiento celular y en la producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina

7.3.1 Diseño experimental

Con el propósito de favorecer el metabolismo para la producción de compuestos responsables de las actividades antiinflamatoria y ansiolítica en cultivos de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*, se evaluaron dos condiciones de estimulación abiótica. La reducción del contenido de nitratos, tomando como base la hipótesis del balance

carbono/nitrógeno (Fritz *et al.*, 2006), establecida para la síntesis de compuestos ricos en carbono (fenoles y terpenos) se estimó como la concentración de nitratos (X_1); y la exposición a niveles elevados de cobre, estimulador que actúa de manera similar al ataque por patógenos induciendo la producción de fitoalexinas (cumarinas y flavonoides) (Mithöfer *et al.*, 2004), establecida específicamente como la concentración de cobre (X_2).

Se planteó optimizar la respuesta mediante el uso de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), con el propósito de identificar y potenciar el efecto de la concentración de ambas variables (nitratos y cobre) sobre la producción de los compuestos escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina.

El diseño factorial 2^K (DF 2^K) inicial permitió conocer el efecto de las dos variables independientes y la significancia de la interacción de ambos factores, además de proporcionar el modelo matemático a partir del cual se establecieron los intervalos en los que se mantuvieron las concentraciones de las variables independientes para optimizar la respuesta. Para establecer el DF 2^K , las variables independientes se codificaron en dos niveles (+1, -1) establecidos a partir de los valores de nitratos totales (27.4 mM, 11.5 mM KNO_3 y 15.9 mM NH_4NO_3) y cobre (0.1 μM CuSO_4) presentes en el medio de cultivo MS completo (X_1 y X_2 , 0,0, puntos centrales, Tabla 2).

Para obtener los datos correspondientes del DF 2^K se desarrollaron suspensiones celulares durante un periodo de 14 días de cultivo. Este periodo de cultivo se determinó previamente a partir de las cinéticas tipo lote, como aquel en el que se obtuvo la biomasa máxima y mayor producción de escopoletina y de 3-O- β -D-glucósido de quercetina. Para este procedimiento se tomaron en cuenta tres variables dependientes a optimizar: el crecimiento celular medido como biomasa máxima en peso seco (Y_1) y la producción ($\mu\text{g L}^{-1}$) y/o rendimiento ($\mu\text{g g}_{\text{PS}}^{-1}$) de escopoletina (Y_2) y de 3-O- β -D-glucósido de quercetina (Y_3).

Los resultados de la respuesta de las variables dependientes en el DF 2^K fueron comparados a través de un ANOVA, a partir del cual se obtuvo un modelo matemático lineal con el que fue posible ubicar los niveles de los estimuladores que definirían la dirección a seguir para ubicar región de respuesta óptima (Van Ryswyk y Van Hecke, 1991).

Dónde:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{1,2} X_1 X_2$$

Y = Respuesta establecida (Y_1 = biomasa máxima; producción y/o rendimiento de escopoletina y Y_3 = 3-O- β -D-glucósido de quercetina).

X_1 = Concentración de nitratos.

X_2 = Concentración de cobre.

β_0 = Intercepto (valor obtenido cuando los niveles de nitratos y cobre están en su valor central, es decir, cuando X_1 y $X_2 = 0$).

β_1 = Coeficiente que indica el efecto de la variable X_1 sobre la respuesta.

β_2 = Coeficiente que indica el efecto de la variable X_2 sobre la respuesta.

$\beta_{1,2}$ = Coeficiente que indica el efecto de la interacción entre las variables X_1 y X_2 sobre la respuesta.

Tabla 2. Matriz del DF 2^k utilizado para el establecimiento de cinéticas de crecimiento y producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en cultivos de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*.

Experimentos	Variables codificadas		Nitratos (NO ₃ ⁻ , mM)	Cobre (Cu ²⁺ , μ M)
	X ₁ (nitratos)	X ₂ (cobre)		
1	-1	-1	13.7	0.01
2	+1	-1	41.1	0.01
3	0	0	27.4	0.1
4	-1	+1	13.7	1
5	+1	+1	41.1	1

El DF 2^k declaró significancia del efecto de la interacción sobre la respuesta ($p < 0.05$), indicando que la región de respuesta máxima se encontraba en la zona de los intervalos utilizados de los estimuladores (Palasota *et al.*, 1992). Con este modelo, fue posible detectar el punto de inflexión de las concentraciones de nitratos totales y cobre, con las que se completó el Diseño en Estrella (DE), que tendría como factor común con el DF 2^k los puntos centrales de éste (Tabla 3.) para generar el Diseño Compuesto Central (DCC) correspondiente (Van Ryswyk y Van Hecke, 1991; Palasota y Deming, 1992). Con el DCC se podrían definir las concentraciones óptimas para el crecimiento celular (Y_1) y como

variable de producción, los rendimientos ($\mu\text{g g}_{\text{PS}}^{-1}$) de escopoletina (Y_2) y de 3-O- β -D-glucósido de quercetina (Y_3) al día 14 de cultivo.

El análisis de los datos en el modelo de segundo orden (modelo cuadrático) con dos factores nitratos (X_1) y cobre (X_2) generó la expresión matemática:

Dónde:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{1,2} X_{1,2} + \beta_{1,1} X_1^2 + \beta_{2,2} X_2^2$$

Y = Respuesta establecida (Y_1 = biomasa máxima; producción y/o rendimiento de Y_2 = escopoletina y Y_3 = 3-O- β -D-glucósido de quercetina).

β_0 = valor promedio de la respuesta, en ausencia del efecto de los factores nitratos y cobre.

β_1 = razón de cambio (efecto lineal) de nitratos sobre la respuesta promedio.

β_2 = razón de cambio (efecto lineal) de cobre sobre la respuesta promedio.

$\beta_{1,1}$ = razón de cambio (efecto cuadrático) de nitratos sobre la respuesta promedio.

$\beta_{2,2}$ = razón de cambio (efecto cuadrático) de cobre sobre la respuesta promedio.

$\beta_{1,2}$ = razón de cambio del efecto de interacción entre nitratos y cobre sobre la respuesta promedio.

Tabla 3. Matriz del diseño DCC utilizado para el crecimiento y producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en cultivos de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*.

Variables codificadas		Nitratos (NO_3^- , mM)	Cobre (Cu^{2+} , μM)
X_1 (nitratos)	X_2 (cobre)		
+1	-1	41.1	0.01
-1	-1	13.7	0.01
+1	+1	41.1	1
-1	+1	13.7	1
Medio MS completo			
0	0	27.4	0.1
0	-1.414	27.4	0
0	+1.414	27.4	1.2
-1.414	0	8.03	0.1
+1.414	0	46.77	0.1

7.3.2 Determinaciones analíticas

7.3.2.1 Crecimiento celular

Al final del periodo de cultivo (14 días), se cosecharon 6 matraces por cada condición experimental. La suspensión celular de cada matraz fue filtrada al vacío en un embudo Buchner (papel filtro Watman No.1, 5.5 cm diámetro) y la biomasa retenida se lavó con agua destilada. La biomasa se secó en estufa a 65 °C por 48 h, se registró el peso seco (PS, g L⁻¹) y se calculó la tasa media de crecimiento celular (Y₁) bajo cada condición nutricional registrada (Pérez-Hernández et al., 2014; Nicasio-Torres et al., 2016).

7.3.2.2 Rendimiento de escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina

La biomasa seca (200 mg) de cada uno de los matraces seleccionados a los 14 días del cultivo en lote, fueron extraídas con metanol (1:20 P/V) para los análisis por CLAR de escopoletina (Y₂) y 3-O-β-D-glucósido de quercetina (Y₃). Los rendimientos reportados representan la media de 6 matraces crecidos independientemente en cada condición experimental. El crecimiento celular (biomasa en PS, Y₁) y los rendimientos (μg g_{PS}⁻¹) de escopoletina (Y₂) y 3-O-β-D-glucósido de quercetina (Y₃) del DCC se analizaron con una prueba de ANOVA, estos resultados se expresaron de acuerdo con la ecuación cuadrática $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{1,2} X_{1,2} + \beta_{1,1} X_1^2 + \beta_{2,2} X_2^2$ descrita previamente. Con este modelo matemático, la superficie de respuesta fue graficada para cada variable de respuesta.

Para conocer si la producción de ambos compuestos fue favorecida por la estimulación abiótica, los rendimientos de escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina fueron comparados con un ANOVA y una post-prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

7.4. Obtención del extracto metanólico y fracciones activas del cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*

Para la evaluación biológica la biomasa seca y molida (200 g) del cultivo de células en suspensión crecidos en medio MS completo en sales, fue extraída por maceración con metanol grado reactivo (Merck, México) en una proporción 1:10 (P/V) por 24 h, en agitación y en oscuridad, repitiendo el proceso tres veces. Los extractos se filtraron con papel Whatman no. 1, se reunieron y se concentraron a presión reducida en un rotavapor. El extracto metanólico resultante (TaM) se almacenó en un frasco protegido de la luz.

Posteriormente, el extracto (37 g) se disolvió con metanol, se sonicó (5 min, 40 kHz) y absorbió con 50 g de silica gel (35 g de fase normal y 15 g de fase reversa RP-18); el extracto se fraccionó en columna (9.5 x 10.5 cm) empacada con 100 g de silica gel RP-18 eluyendo con un gradiente de H₂O:CH₃CN aplicando vacío (Tabla 4). Se colectaron alícuotas de 2 L y se concentraron a presión reducida en rotavapor.

Tabla 4. Condiciones de fraccionamiento en columna del extracto metanólico de biomasa de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*.

Fracciones	Sistema de elución
	H ₂ O:CH ₃ CN
TaM-1	100:0
TaM-2	90:10
TaM-3	80:20
TaM-4	70:30
TaM-5	50:50
TaM-6	30:70
TaM-7	0:100
TaM-8	100:0 MeOH

Las fracciones (TaM-1 a TaM-8) y estándares de compuestos fenólicos se analizaron por CCF para identificar la presencia de compuestos de naturaleza cumarínica o flavonoide. La fracción TaM-2 (2.1 g) que contiene compuestos fenólicos, se absorbió con 4 g de silica (2 g fase normal y 2 g fases reversa RP-18) y se fraccionó en una columna de vidrio (34 x 2 cm) empacada con 20 g de silica gel RP-18, utilizando un sistema de elución de polaridad decreciente de H₂O:CH₃CN y lavado final con acetonitrilo. Se obtuvieron 64 alícuotas de 20 mL cada una, se concentraron a presión reducida y se reunieron en 16 subfracciones (TaMC2) de acuerdo a sus características químicas (Tabla 5).

En las subfracciones TaMC2-5, TaMC2-9 y TaMC2-13 se identificó la presencia de las cumarinas esculetina, escopoletina y esculina.

Tabla 5. Condiciones de separación cromatográfica en columna de la fracción TaM-2.

Fracciones	Reunión	Sistema H₂O:CH₃CN
1-9	TaMC2-1	100:0
10-16	TaMC2-2	95:5
17-19	TaMC2-3	95:5
20	TaMC2-4	90:10
21-23	TaMC2-5	90:10
24, 25	TaMC2-6	90:10
26-28	TaMC2-7	90:10
29	TaMC2-8	85:15
30	TaMC2-9	85:15
31	TaMC2-10	85:15
32, 33	TaMC2-11	85:15
34-36	TaMC2-12	85:15
37-43	TaMC2-13	80:20
44-48	TaMC2-14	80:20
49-54	TaMC2-15	75:25
55-64	TaMC2-16	75:25
L	TaMC2-17	0:100

7.4.1 Identificación de escopoletina y ácido *p*-cumárico

La subfracción TaMC2-13 (43.9 mg) se disolvió en agua y se le agregó diclorometano formándose dos fases: fracción acuosa (TaMC2Aq) y fracción de diclorometano (TaMC2D). Las dos fracciones se concentraron a presión reducida en un rotavapor y fueron analizadas por CLAR (método descrito en la tabla 6). En la fracción TaMC2D se identificó escopoletina y un compuesto no identificado en la fracción TaMC2ACoEt derivada de una segunda partición de la subfracción TaMC2Aq.

El proceso de partición de la subfracción TaMC2-13 (185.5 mg) se repitió con un sistema de H₂O:CH₂Cl₂ 50:50. La subfracción TaMC2D2 (29.3 mg) correspondiente a la fase orgánica, se disolvió con diclorometano, absorbió con 2 g de silica gel y purificó con un sistema de elusión de CH₂Cl₂:CH₃OH por cromatografía en columna abierta (30 x 1.5 cm) empacada con 3 g de silica gel. Se obtuvieron 9 fracciones de 10 mL cada una, se concentraron y reunieron de acuerdo con sus características químicas en 4 reuniones (Tabla 7). Al final, se realizó una

elusión con acetato de etilo (200 mL) y otra con metanol (200 mL). La escopoletina se identificó en la fracción TaMC2D2-1 y el ácido *p*-cumárico en la fracción TaMC2D2-6.

Tabla 6. Sistema de elución cromatográfica por CLAR para el análisis de las fracciones del extracto metanólico de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*.

Tiempo (min)	Flujo (mL min ⁻¹)	%A (TFA 0.5%)	%D (CH ₃ CN)
0	0.9	100	0
1	0.9	100	0
2	0.9	95	5
3	0.9	95	5
4	0.9	70	30
20	0.9	70	30
21	0.9	50	50
22	0.9	50	50
23	0.9	50	50
24	0.9	20	80
25	0.9	20	80
26	0.9	0	100
27	0.9	0	100
28	0.9	100	0
30	0.9	100	0

Tabla 7. Condiciones de separación cromatográfica en columna de la subfracción TaMC2D2.

Fracciones	Reunión	Sistema CH ₂ Cl ₂ :MeOH
1-3	TaMC2D2-1	100:0
4-6	TaMC2D2-2	100:0
7, 8	TaMC2D2-3	100:0
9	TaMC2D2-4	95:5
L _{ACoEt}	TaMC2D2-5	100 ACoEt
L _{MeOH}	TaMC2D2-6	0:100

7.4.2 Grupos animales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa ICR con un peso de 28 a 34 g. Los ratones se conservaron en cajas de acrílico con alimento (Harlan rodent lab diet) y agua *ad libitum*, en un cuarto con control de temperatura a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa del 70-75% y ciclos de 12 h de luz y oscuridad. Los estudios fueron realizados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y uso de Animales de Laboratorio). El uso ético de los animales fue aprobado a través del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud (CLIES 1702) del Instituto Mexicano del Seguro Social, quién asignó el número de registro R-2016-1702-55 al protocolo. Para obtener datos consistentes se utilizó una cantidad mínima de animales ($n = 5$), los cuales fueron privados del alimento durante 24 h previas al desarrollo de los experimentos y se colocaron en cajas con rejillas de malla en el fondo para evitar coprofagia.

7.4.3 Inducción de lesiones gástricas con etanol absoluto

Las ulceraciones fueron producidas por la administración oral de etanol absoluto al 10 % del peso corporal. El extracto metanólico (TaM, 100 mg kg^{-1}) del cultivo de células en suspensión establecido en medio MS completo, las fracciones TaMC2-5 y TaMC2-9 (10 mg kg^{-1}), el vehículo (Tween 20 al 1%) y famotidina (20 mg kg^{-1}) fueron administrados una hora antes de la administración del etanol absoluto. Cumplido una hora, los ratones se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital sódico (PiSA Agropecuaria) y dislocación cervical, se removieron los estómagos, abrieron a lo largo de la curvatura mayor y se realizaron lavados con agua para eliminar los residuos de alimento. Las lesiones se examinaron macroscópicamente, se tomaron fotografías de cada uno de los estómagos y se almacenaron a -70°C . Se determinó la superficie total del estómago (mm^2), así como el número y la severidad de las lesiones hemorrágicas por estómago y expresadas como superficie gástrica ulcerada total (mm^2) mediante el análisis de imágenes con el software ImageJ. Las medias de cada grupo fueron calculadas con base al Índice de ulceración (IU) y el porcentaje de protección se calculó con base en el grupo tratado con el vehículo (Dias et al., 2000; Vidari et al., 2003).

$$IU = \left(\frac{\text{área ulcerada}}{\text{área total del estómago}} \right) * 100$$

$$\% \text{ Protección} = \left[\frac{IU \text{ control} - IU \text{ grupo tratado}}{IU \text{ control}} \right] * 100$$

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Crecimiento celular

Los callos generados de explantes de hoja de *T. americana* var. *mexicana* en medio MS con 2.0 mg mL^{-1} de 2,4-D en combinación con 0.5 mg L^{-1} de KIN fueron friables y presentaron un color café, en los subcultivos subsecuentes la coloración cambió a un color café claro (Figura 7a). La suspensión celular en lote iniciada con estos callos cultivada en medio MS completo en sales (27.4 mM de nitratos totales y $0.1 \text{ }\mu\text{M}$ de cobre), estuvo compuesta por pequeños agregados celulares de coloración café claro (Figura 7b y 7c). En la fase de crecimiento logarítmico el cultivo adquirió una coloración café oscura, debida posiblemente a la producción de compuestos fenólicos (Bourgau et al., 2001; Matkowski, 2008). Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria, recuperó la coloración café clara la cual se mantuvo hasta el final del periodo de cultivo (día 28, Figura 7d). Las células presentaron una morfología característica, de forma redondeada y ovalada, se observaron agregados celulares pequeños ($<5 \text{ mm}$) y células libres ($<250 \text{ }\mu\text{m}$); la viabilidad celular al final de la fase de crecimiento exponencial (14 días) fue del 80% (Figura 7e).

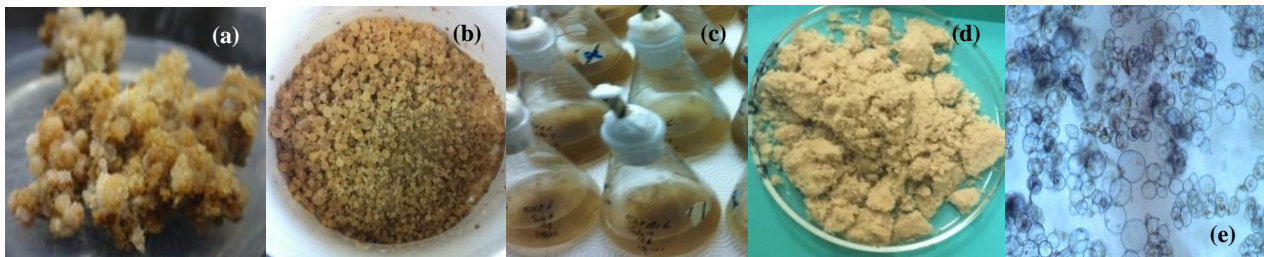


Figura 7. Imágenes de la biomasa de callos derivados de explantes de hoja generados con 2.0 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.5 mg L^{-1} KIN (a), de los cultivos de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* establecidos con esos callos (b, c, d,) y teñidos con Azul de Evans y observados al microscopio a 10X (e).

Las cinéticas de crecimiento de las suspensiones celulares mostraron un patrón sigmoideal (Figura 8): la fase *lag* tuvo una duración de 2 días y la fase logarítmica de crecimiento duró 12 días, obteniendo la biomasa máxima ($17.86 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ L}^{-1}$) a los 14 días. Después, se alcanzó la fase estacionaria y subsecuentemente la biomasa en peso seco decayó hasta el final del periodo de cultivo como consecuencia del consumo de nutrientes. Los parámetros cinéticos determinados como el $t_c = 4.8 \pm 0.88$, $t_d = 6.60 \pm 0.78 \text{ d}$, $\mu_{\text{máx}} = 0.107 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ y la biomasa celular producida respecto a la sacarosa $Y = 0.637 \pm 0.067 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}_{\text{sacarosa}}^{-1}$, se encuentran entre los parámetros cinéticos reportados para otras especies leñosas como *Bursera linanoe* (Pavón-Reyes et al., 2016), *Taxus globosa* (Tapia et al., 2013), *Prosopis laevigata* (Trejo-Espino et al., 2011) y *Pinus pinaster* (Azevedo et al., 2008).

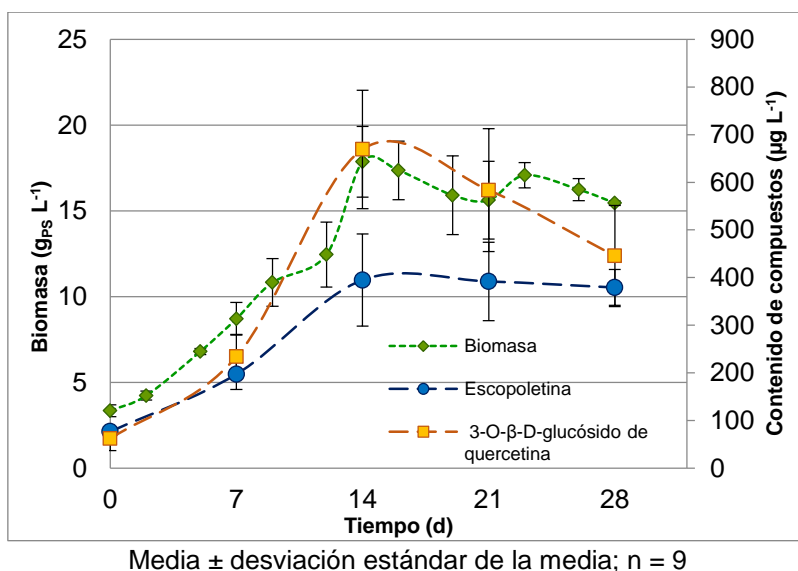


Figura 8. Cinéticas de crecimiento y producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina en los cultivos en lote de células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Para obtener los datos correspondientes del DF 2^k se crecieron suspensiones celulares durante un periodo de 14 días de cultivo, tiempo determinado en las cinéticas tipo lote en el que se obtuvo la biomasa máxima en el medio MS completo en sales (Figura 8). Las células en suspensión se cultivaron en medio MS con diferentes concentraciones de nitratos y cobre determinadas por el DF 2^k (Tabla 8), los cultivos se detuvieron, cosecharon y analizaron al

cabo de los 14 días de cultivo, registrando el peso de la biomasa desarrollada y el contenido de los compuestos activos. El efecto de ambos nutrientes y su interacción fueron significativos para el crecimiento de la suspensión celular ($\rho < 0.01$). El efecto negativo de los nitratos totales y el efecto positivo del cobre indican que, de manera independiente un nutriente del otro o en combinación, los niveles de nitratos totales deben reducirse y el cobre debe incrementar para optimizar el crecimiento de la suspensión celular, de acuerdo con la ecuación $Y_1 = 18.98 - 2.79X_1 + 0.49X_2 - 0.59X_1X_2$. Los mayores valores de las biomazas, en su concentración máxima, se obtuvieron con 13.7 mM de nitratos totales en combinación con 1 μ M de cobre (niveles -1, +1).

Con este modelo fue posible determinar las concentraciones de nitratos totales y cobre que podrían definir las concentraciones óptimas para el crecimiento de las células en suspensión (Y_1), para completar el DCC con cinco (-1.41, -1, 0, +1 y +1.41) niveles codificados (Tabla 9). Los coeficientes del modelo del DCC indicaron que la concentración total de nitratos debería disminuir y que la concentración de cobre aumentar de manera independiente en el medio de cultivo o combinados ($\rho < 0.01$) para favorecer el crecimiento celular de acuerdo con la ecuación $Y_1 = 18.05 - 1.8X_1 + 0.63X_2 - 0.6X_1X_2 + 1.06X_1^2 - 0.98X_2^2$. El punto de inflexión para optimizar el crecimiento evaluado como biomasa máxima se obtuvo con 13.7 mM de nitratos totales en combinación con 1 μ M cobre (Tabla 9, Figura 9).

Tabla 8. Producción de biomasa máxima, escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina en la suspensión celular de *Tilia americana* var. *mexicana* después de 14 días de cultivo y los coeficientes obtenidos en el DF 2^K.

X ₁ (NO ₃ ⁻)	X ₂ (Cu ²⁺)	NO ₃ ⁻ (mM)	Cu ²⁺ (μM)	Biomasa máxima (g _{PS} L ⁻¹)	Escopoletina		3-O-β-D-glucósido de quercetina		
					(μg L ⁻¹)	(μg g _{PS} ⁻¹)	(μg L ⁻¹)	(μg g _{PS} ⁻¹)	
+1	-1	41.1	0.01	16.53 ± 0.33	86.31 ± 2.23	6.35 ± 0.49	445.45 ± 16.71	26.70 ± 1.07	
-1	-1	13.7	0.01	20.91 ± 0.97	187.04 ± 11.16	10.27 ± 0.79	626.98 ± 62.12	28.60 ± 1.95	
+1	+1	41.1	1	16.31 ± 0.86	103.01 ± 10.39	8.35 ± 1.03	269.22 ± 24.96	23.88 ± 2.76	
-1	+1	13.7	1	23.07 ± 0.68	256.98 ± 11.13	10.89 ± 0.76	606.01 ± 63.37	26.43 ± 2.26	
0	0	Medio MS completo		18.05 ± 0.09	182.23 ± 21.73	10.70 ± 0.73	511.53 ± 40.34	25.81 ± 0.79	
		27.4	0.1						
Coeficientes (modelo lineal)									
				β ₀	18.98	163.11	9.31	491.84	26.28
				β ₁ (NO ₃ ⁻)	-2.79**	-63.66**	-1.62 **	-129.60**	-1.10**
				β ₂ (Cu ²⁺)	0.49**	21.68**	0.66**	-49.31**	-1.24**
				β _{1,2} (NO ₃ ⁻ , Cu ²⁺)	-0.59**	-13.29**	0.35	-38.81**	-0.17

Los valores de los coeficientes fueron significativamente diferentes cuando fueron seguidos por ** ($p < 0.01$).

Tabla 9. Matriz del DCC usada para el análisis del contenido de nitratos totales y cobre en el medio MS para la producción de escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina en el cultivo de células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana*.

X_1 (NO_3^-)	X_2 (Cu^{2+})	NO_3^- (mM)	Cu^{2+} (μM)	Biomasa máxima ($\text{g}_{\text{PS}} \text{L}^{-1}$)	Escopoletina		3-O-β-D-glucósido de quercetina		
					($\mu\text{g g}_{\text{PS}}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g g}_{\text{PS}}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	
+1	-1	41.1	0.01	16.53 ± 0.33	6.35 ± 0.49	86.31 ± 2.23	26.70 ± 1.07	445.45 ± 16.71	
-1	-1	13.7	0.01	20.91 ± 0.97	10.27 ± 0.8	187.04 ± 11.16	28.57 ± 1.95	626.98 ± 62.12	
+1	+1	41.1	1	16.31 ± 0.86	8.35 ± 1.026	103.01 ± 10.39	23.88 ± 2.76	269.22 ± 24.96	
-1	+1	13.7	1	23.07 ± 0.68	10.89 ± 0.76	256.98 ± 11.13	26.43 ± 2.26	606.01 ± 63.37	
0	0	Medio MS 27.4 0.1		18.05 ± 0.09	10.70 ± 0.73	182.23 ± 21.73	25.81 ± 0.80	511.53 ± 40.34	
0	-1.414	27.4	0	13.95 ± 0.33	10.77 ± 3.19	140.43 ± 31.83	32.38 ± 2.11	431.90 ± 37.43	
0	+1.414	27.4	1.2	16.13 ± 0.80	28.78 ± 4.29	526.91 ± 62.35	21.09 ± 2.42	377.88 ± 33.11	
-1.414	0	8.03	0.1	20.28 ± 0.23	13.36 ± 2.01	314.83 ± 30.39	66.14 ± 4.77	1512.15 ± 129.60	
+1.414	0	46.77	0.1	17.97 ± 0.27	9.83 ± 1.12	293.62 ± 60.96	33.51 ± 3.41	606.03 ± 37.80	
Coeficientes (modelo cuadrático)									
				β_0	18.05	10.69	182.23	25.81	511.53
				$\beta_1 (\text{NO}_3^-)$	-1.8**	-1.432**	-35.6**	-6.32**	-224.98**
				$\beta_2 (\text{Cu}^{2+})$	0.63**	3.51**	79.16**	-2.62**	-34.21
				$\beta_{1,2} (\text{NO}_3^-, \text{Cu}^{2+})$	-0.6	0.35	-13.29	-0.17	-38.81
				$\beta_{1,1} (\text{NO}_3^-)^2$	1.06**	-1.23	20.84	9.04**	212.48**
				$\beta_{2,2} (\text{Cu}^{2+})^2$	-0.98**	2.86**	-35.6	-2.51	-114.71**

Los valores de los coeficientes fueron significativamente diferentes cuando fueron seguidos por ** ($p < 0.01$).

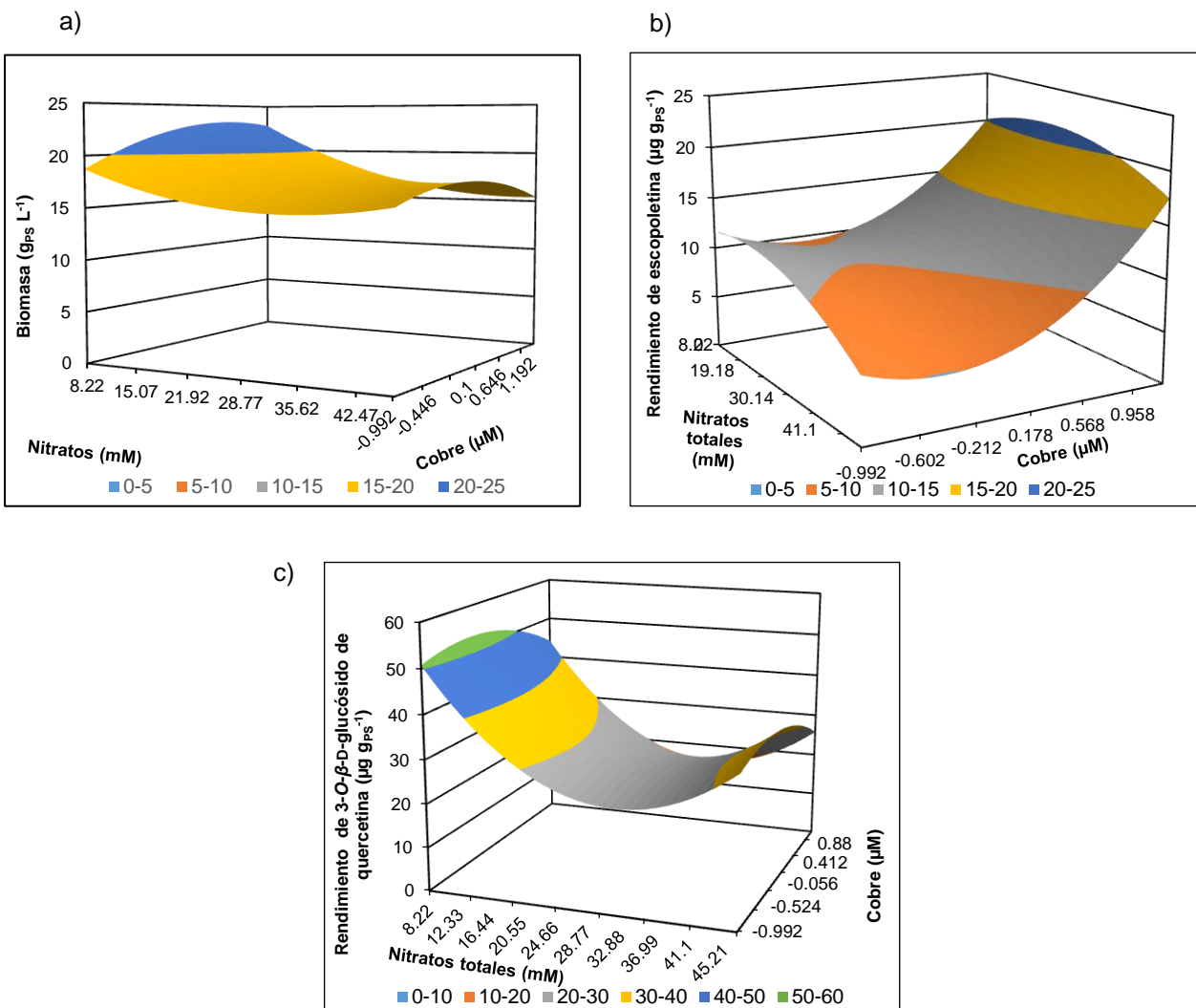


Figura 9. Superficies de respuesta de a) producción de biomasa máxima, b) rendimiento de escopoletina y c) rendimiento de 3-O-β-D-glucósido de quercetina en el Diseño Compuesto Central en los cultivos de células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Morfológicamente, las células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* crecieron en pequeños agregados (< 5mm) multicelulares de coloración café claro (Figura 10a), las células presentaron características similares cuando fueron cultivadas en medio MS sin cobre (Fig. 10b); cuando la concentración de nitratos se incrementó presentaron coloración café oscuro (Fig. 10c); color amarillo claro cuando se incrementó el cobre (Fig. 10d); y verde grisáceo cuando se redujo la concentración de nitratos totales (Fig. 10e). Basado en la hipótesis del balance C/N, el cambio de coloración y el incremento en la biomasa máxima que ocurre en el medio MS con reducción del contenido de nitratos totales (Fig. 10e), podría deberse a la síntesis de compuestos carbonados como los fenólicos, por incremento en la formación de aglomerados celulares debido probablemente a la lignificación de la pared celular (Fritz et al., 2006). El cambio en las características celulares causadas por incremento de cobre (Fig. 10d) podría deberse a las interacciones entre este metal y los grupos hidroxilo de la lignina y la celulosa en la pared celular, las cuales podrían crear condiciones desfavorables para el crecimiento celular (Chen et al., 2004).



Figura 10. Efecto del contenido total de nitratos y cobre en el medio MS probado en el DCC en el crecimiento de la suspensión celular: a) 27.4 mM NO_3^- , 0.1 μM Cu^{2+} ; b) 27.4 mM NO_3^- , 0 μM Cu^{2+} ; c) 46.77 mM NO_3^- , 0.1 μM Cu^{2+} ; d) 27.4 mM NO_3^- , 1.2 μM Cu^{2+} ; e) 8.03 mM NO_3^- , 0.01 μM Cu^{2+} .

8.2 Producción de escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina

Los extractos metanólicos de los callos desarrollados con 2.0 g L⁻¹ de 2,4-D y 0.5 mg L⁻¹ de KIN y la biomasa de células en suspensión mostraron un perfil químico similar al ser analizadas por CCF y CLAR. La presencia de la escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina en el extracto metanólico de las células en suspensión fue confirmado por la comparación de los tiempos de retención, espectros de absorción y coelusión con estándares (Figura 11). La producción de ambos compuestos estuvo asociada al crecimiento (Figura 8) y la mayor concentración se obtuvo al alcanzar la biomasa máxima durante la fase de mantenimiento. La máxima producción de ambos compuestos a los 14 días fue de 669.15 µg L⁻¹ para 3-O-β-D-glucósido de quercetina y de 394.78 µg L⁻¹ para escopoletina, siendo de los dos, el 3-O-β-D-glucósido de quercetina el compuesto mayoritario.

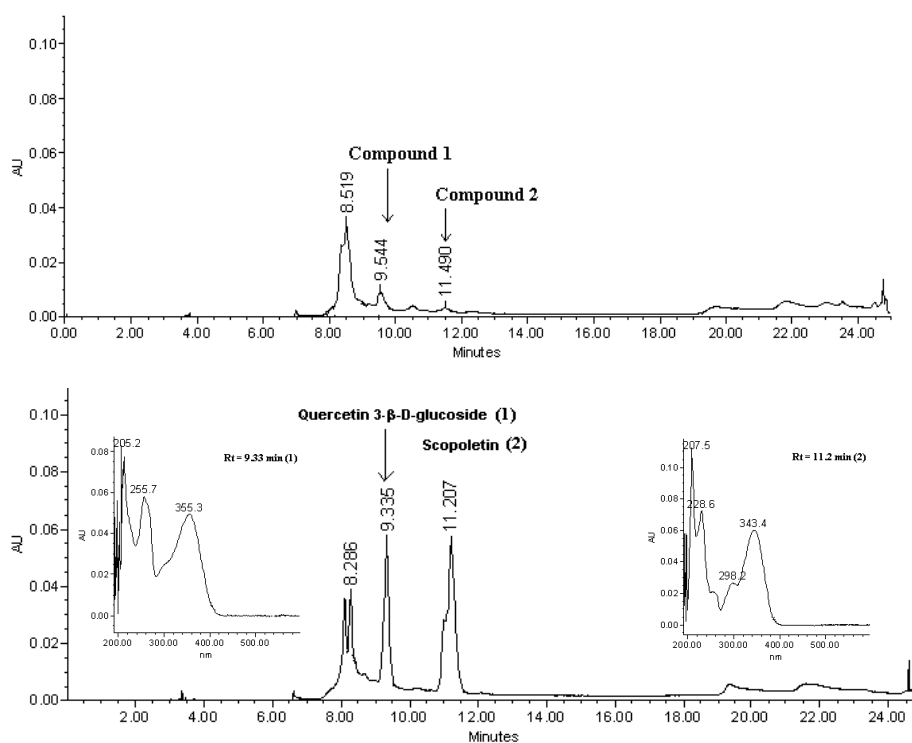


Figura 11. Cromatogramas y espectros de absorción obtenidos de escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina en (a) el extracto metanólico del cultivo de células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana* y (b) en el extracto metanólico con estándares.

Dado que la producción de ambos compuestos estuvo asociada al crecimiento, el efecto de las concentraciones de nitratos totales y cobre fue evaluado a los 14 días de cultivo en los experimentos del DF 2^K. De acuerdo con el ANOVA la producción ($\mu\text{g L}^{-1}$) de escopoletina ($\rho < 0.01$) y 3-O- β -D-glucósido de quercetina ($\rho < 0.01$) fue maximizada por el efecto combinado de ambos nutrientes. Para optimizar la producción de la escopoletina, similar al crecimiento celular, la concentración de nitratos totales debió reducirse y la de cobre incrementar independientemente uno del otro en el medio de cultivo o en combinación, de acuerdo con la ecuación $Y_2 = 163.11 - 63.66X_1 + 21.68X_2 - 13.29X_1X_2$; mientras que para la producción de 3-O- β -D-glucósido de quercetina las concentraciones de nitratos y cobre deben disminuir por si solos o en combinación, de acuerdo con la ecuación $Y_3 = 491.84 - 129.60X_1 - 49.31X_2 - 38.81X_1X_2$ (Tabla 8).

Para evaluar el efecto de ambos elicitores en la producción de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina, los rendimientos ($\mu\text{g g}_{\text{PS}}^{-1}$) de cada compuesto de los experimentos del DF 2^K fueron comparados (Tabla 8). De acuerdo con los valores de los coeficientes β del ANOVA ($\rho < 0.01$) y la ecuación $Y_2 = 9.31 - 1.62X_1 + 0.66X_2 + 0.35X_1X_2$, los rendimientos de escopoletina pueden ser optimizados por un efecto independiente de la reducción de nitratos totales e incremento de las concentraciones de cobre (Tabla 8). Cuando se compararon los rendimientos del 3-O- β -D-glucósido de quercetina, el ANOVA mostró un efecto significativo ($\rho < 0.01$) en la reducción de ambos nutrientes de acuerdo con la ecuación $Y_3 = 26.28 - 1.10X_1 - 1.24X_2 - 0.17X_1X_2$ (Tabla 8). Para conocer si la producción de ambos compuestos fue favorecida por la estimulación abiótica, los rendimientos de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina también fueron comparados con un ANOVA y una *post*-prueba de Tukey ($\rho \leq 0.05$). Los mayores rendimientos de escopoletina y 3-O- β -D-glucósido de quercetina se obtuvieron con 27.4 mM y 13.7 mM de nitratos totales (Tabla 10); además, con la concentración de 13.7 mM de NO_3^- con 0.01 μM de Cu_2^+ y 13.7 mM de NO_3^- y 1 μM de Cu^{2+} el crecimiento celular incrementó 16% y 28% respectivamente, ambas combinaciones en relación al medio MS completo (Tabla 8). Lo anterior implica una ventaja en la producción de los compuestos, dado que al incrementar la biomasa se incrementa de igual forma dicha producción, como se muestra en los datos de rendimiento (Tabla 10). Las concentraciones de cobre evaluadas no mostraron efectos significativos ($\rho > 0.05$) en los rendimientos de producción de ambos activos.

Tabla 10. Efecto de las concentraciones de nitratos totales y cobre en los rendimientos de producción de escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina en las suspensiones celulares de *Tilia americana* var. *mexicana* después de 14 días de cultivo.

X ₁ (NO ₃ ⁻)	X ₂ (Cu ²⁺)	NO ₃ ⁻ (mM)	Cu ²⁺ (μM)	Escopoletina (μg g _{PS} ⁻¹)	3-O-β-D- glucósido de quercetina (μg g _{PS} ⁻¹)
+1	-1	41.1	0.01	6.35 ± 0.49	26.70 ± 1.07
-1	-1	13.7	0.01	10.27 ± 0.79**	28.60 ± 1.95**
+1	+1	41.1	1	8.35 ± 1.03	23.88 ± 2.76
-1	+1	13.7	1	10.89 ± 0.76**	26.43 ± 2.26**
0	0	Medio MS		10.69 ± 0.73**	25.81 ± 0.79**
		27.4	0.1		

Los valores con ** fueron significativamente distintos de acuerdo con la *post*-prueba de Tukey (escopoletina: F = 4.71, $\rho < 0.05$; Tukey_{0.05} = 3.52; 3-O-β-D-glucósido de quercetina: F_{nitratos totales} = 4.22, $\rho < 0.05$, F_{cobre} = 10.12, $\rho < 0.01$, Tukey_{0.05} = 3.52).

Con el objetivo de mejorar los rendimientos en la producción de escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina, el DCC se completó con un Diseño en Estrella (DE) con los puntos -1.414, 0, +1.414 para el análisis de los compuestos en los extractos de las biomásas de las suspensiones celulares a los 14 días de cultivo. Los coeficientes del modelo del DCC indicaron que la concentración de nitratos totales debe reducirse y/o la concentración de cobre incrementar independientemente ($\rho < 0.01$), para favorecer la producción de escopoletina (Tabla 9, Figura 9b).

Por el contrario, para favorecer la producción del 3-O-β-D-glucósido de quercetina, las concentraciones de nitratos totales y cobre deben reducirse de manera independiente una de otra en el medio de cultivo (Tabla 9, Figura 9c). La máxima producción de escopoletina (incremento de aproximadamente 3 veces) se obtuvo con 27.4 mM de nitratos totales y 1.2 μM de cobre. Para el 3-O-β-D-glucósido de quercetina (incremento de aproximadamente 3 veces con respecto a la producción en medio MS completo) las mejores condiciones fueron 8.03 mM de nitratos totales y 0.1 μM de cobre (Tabla 9). El contenido de nitratos totales y cobre que favorece la producción de escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina afectó el crecimiento celular de la suspensión celular de *T.*

americana var. *mexicana*; la mejor condición para su crecimiento fue con 13.7 mM de nitratos totales y 1 μ M de cobre (Tabla 9, Figura 9a).

Existen reportes de la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células en suspensión de plantas estimuladas con elicitores abióticos como la modificación de la fuente de nitrógeno o con cobre, pero existen pocos reportes en los cuales ambos nutrientes fueron modificados al mismo tiempo. Un ejemplo de la modificación de ambos factores fue mostrado en el cultivo de células en suspensión de *Sphaeralcea angustifolia*. La producción de escopoletina por los cultivos de *T. americana* var. *mexicana* ($394.78 \mu\text{g L}^{-1}$) es mayor que la producida en los cultivos de *S. angustifolia* ($6.38 \mu\text{g L}^{-1}$) en matraces agitados crecidos en medio MS completo. Similar a los resultados obtenidos en este trabajo, la reducción del contenido de nitratos totales (2.74 mM) y el incremento de cobre (2 μ M) estimuló también la producción de escopoletina ($654 \mu\text{g L}^{-1}$) en la biomasa de *S. angustifolia*. Contenidos de 2.42 mM de NO_3^- con 1.81 μ M de Cu^{2+} fueron reportados para la producción máxima acumulación de cumarinas tomentina y escopoletina ($227.5 \mu\text{g L}^{-1}$) en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia*, mientras que para ácido sphaerálcico (1.42 mg L^{-1}) con 1.37 mM de NO_3^- y 1 μ M de Cu^{2+} con sin afectar el crecimiento celular (Pérez-Hernández et al., 2014; Nicasio-Torres et al., 2016; Pérez-Hernández et al., 2019). Por otro lado, la modificación del contenido de cobre en el medio de cultivo MS (variando las concentraciones de 5, 10 y 50 μ M de CuSO_4) en cultivos de células en suspensión de *Angelica archangelica* estimuló la producción de escopoletina con un efecto dosis dependiente (Siatka et al., 2017) sin afectar el crecimiento de la suspensión celular. Estos resultados son similares a los obtenidos con incrementos de cobre a 1.2 μ M, independientemente de la concentración de nitratos totales, para la producción de escopoletina por las suspensiones celulares de *T. americana* var. *mexicana* donde el crecimiento celular no se afectó considerablemente.

La producción de escopoletina y otras cumarinas también se ha logrado en cultivos *in vitro* de diferentes especies de plantas como *Ammi majus* (Staniszewska et al., 2003) con el uso de elicitores (p. ej. el S-metil-éster del ácido 1,2,3-benzotiadiazol-7-carbotioico (BION[®]) y con el lisado de *Enterobacter sakazaki*). La escopoletina fue identificada en los cultivos de callos derivados de explantes de hipocótilos de plántulas de *A. majus*, el elicitor más efectivo para incrementar su producción fue el lisado de *E. sakazaki*. Por otra parte, Siatka y Reichling (2000) reportaron el incremento de 12 veces en la acumulación de escopoletina en cultivos de células en suspensión de *Archangelica officinalis* elicitada con *Fusarium oxysporum* en comparación con el control (0.2 mg mL^{-1}).

La producción de 3-O- β -D-glucósido de quercetina en la suspensión celular de *T. americana* var. *mexicana* se incrementó cuando fue cultivada en medio MS con 8.03 mM de nitratos totales y 0.1 μ M de cobre; un incremento en la concentración del metal disminuyó la producción de este flavonoide. En cultivos de células en suspensión de *Pueraria candollei* var. *candollei* y *Pueraria candollei* var. *mirifica*, el incremento de 5 veces (0.5 a 2.5 μ M de cobre) en la concentración del nutriente en el medio de cultivo produjo una ligera acumulación de isoflavonoides totales en la fase estacionaria de ambos cultivos, debido posiblemente a la inducción por el cobre (Korsangruang et al. 2010). Un efecto similar fue observado en el incremento de la producción de gengenósidos en raíces de *Panax ginseng* al incrementar el contenido de cobre de 5 a 25 μ M en un cultivo de células en suspensión a nivel biorreactor (Ali et al., 2006).

Existen, en nuestro conocimiento, pocos trabajos dedicados a la producción de 3-O- β -D-glucósido de quercetina en cultivos de células en suspensión. Dichos trabajos están orientados principalmente a la bioconversión de quercetina a glicosil-ésteres por la enzima glicosiltransferasa en cultivos *in vitro* de *Vitis sp.*, *Ipomea batata* y *Crocus sativum*. Entre los flavonoides obtenidos por bioconversión están el 3-O- β -D-glucósido de quercetina (Kodama et al., 1990; Kokubo et al., 1991).

Por otra parte, los cultivos de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* empleados en este trabajo no produjeron el compuesto ansiolítico tilirósido identificado en hojas e inflorescencias. La producción de este flavonoide (88.24 μ g g_{PS}⁻¹) se reportó recientemente en callos de *T. americana* var. *mexicana* establecidos a partir de yemas apicales cultivadas en medio MS con 0.005 mg L⁻¹ de TDZ en combinación con 0.1 mg L⁻¹ de AIB (Flores-Sánchez et al., 2019). Por el contrario, el contenido de escopoletina (10.89 μ g g_{PS}⁻¹) que reportamos en los cultivos en suspensión en el tratamiento correspondiente al punto central (0,0) del DCC, fue similar al detectado en callos de yemas apicales (7.64 μ g g_{PS}⁻¹), mientras que para el mismo tratamiento el contenido de 3-O- β -D-glucósido de quercetina (25.81 μ g g_{PS}⁻¹) fue menor al reportado para el mismo cultivo de callos (115.86 μ g g_{PS}⁻¹). La diferencia en el perfil químico podría deberse a los reguladores del crecimiento empleados para la generación de callos, así como al origen del explante, implicando la expresión de factores genéticos, ontogenéticos y morfogenéticos (Flores-Sánchez et al., 2019; Yang et al., 2018).

8.2.1 Producción de biomasa y compuestos activos en cultivos de células en suspensión en lote de *T. americana* var. *mexicana* en las condiciones nutricionales determinadas con la MSR

Las condiciones nutricionales determinadas como óptimas en el estudio de MSR (DF 2^k y DCC) para la producción de escopoletina (27.4 mM nitratos, 1.2 μM cobre) y 3-O-β-D-glucósido de quercetina (8.03 mM nitratos, 0.1 μM cobre) se evaluaron en cultivos en lote durante 21 días.

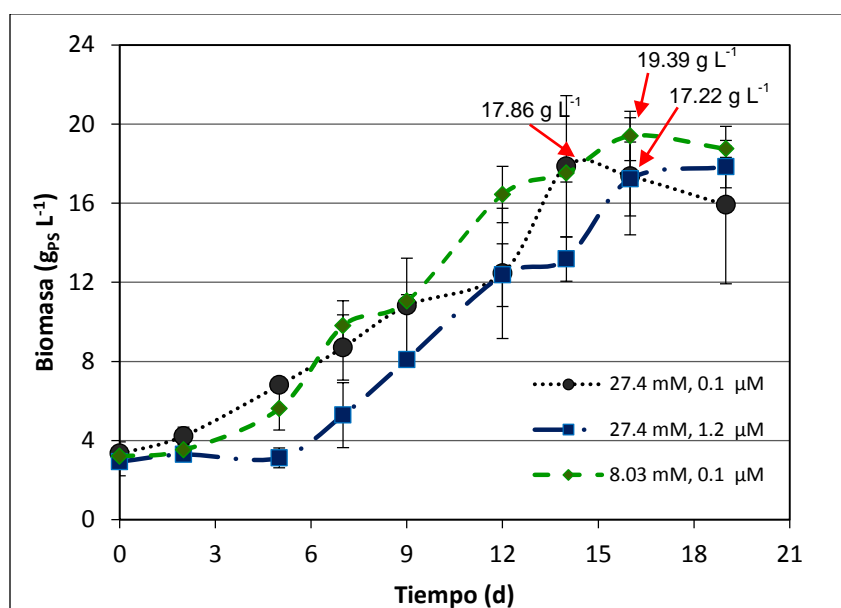


Figura 12. Cinéticas de producción de biomasa en las condiciones nutricionales determinadas con la MSR para la producción de escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina y en el medio MS completo en sales.

Las curvas de crecimiento presentaron un comportamiento sigmoideo similar. En las suspensiones celulares cultivadas en medio MS con el contenido de cobre incrementado a 1.2 μM, la fase de adaptación se prolongó a 5 días de cultivo (Figura 12), posiblemente por la interacción del cobre con los grupos hidroxilo de la lignina y la celulosa de la pared celular, que favorecieron la formación de agregados celulares como mecanismo de protección celular (Chet et al., 2004). La fase de crecimiento logarítmico duró hasta los 16 días alcanzando después la fase de crecimiento estacionario. En las suspensiones

celulares cultivadas con el contenido de nitrato total reducido a 8.03 mM, el patrón de crecimiento fue similar al presentado por la suspensión desarrollada en medio MS completo, aunque en este caso (8.03 mM de nitrato total) se observó un incremento del 12.6% en la biomasa respecto a la obtenida en el experimento control (MS completo).

Los tiempos en los cuales se alcanzó la biomasa máxima fueron distintos entre cada condición, lográndose en 14 días en el medio MS completo en sales y en 16 días en los tratamientos con 8.03 mM nitratos y 0.1 μM cobre y 27.4 mM nitratos y 1.2 μM cobre, respectivamente sin embargo la producción de biomasa en estos días fue similar.

Los parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos en los experimentos con cada condición experimental se compararon mediante un ANOVA simple, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11. Los valores de biomasa máxima ($B_{\text{máx}}$), índice de crecimiento (I_c) y rendimiento (Y) no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados; sin embargo, en los valores de las velocidades específicas de crecimiento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) y tiempos de duplicación (t_d) si existieron diferencias significativas. En el medio MS formulado con los elicitores abióticos a una concentración de 27.4 mM de nitratos totales y 1.2 μM de cobre, se observó un efecto significativo únicamente sobre la biomasa. En este caso, la biomasa se desarrolló más rápido en la fase de crecimiento exponencial, y de igual forma el tiempo de duplicación se redujo (Tabla 11). En general estos elicitores no afectaron el comportamiento cinético de la biomasa, en los tres tratamientos no se observó un decremento inesperado o muerte de la suspensión celular a lo largo del periodo de cultivo.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de crecimiento de los cultivos de células en suspensión en lote en las condiciones nutricionales determinadas con la MSR y en el medio MS completo en sales.

Parámetros cinéticos	Tratamientos		
	27.4 mM NO_3^- , 0.1 μM Cu^{2+}	27.4 mM NO_3^- , 1.2 μM Cu^{2+}	8.03 mM NO_3^- , 0.1 μM Cu^{2+}
$B_{\text{máx}}$ ($\text{g}_{\text{PS}} \text{L}^{-1}$)	17.86 \pm 3.57	17.83 \pm 1.05	19.39 \pm 1.25
I_c	4.81 \pm 0.88	5.38 \pm 1.9	5.06 \pm 0.45
Y ($\text{g}_{\text{PS}} \text{g}_{\text{sacarosa}}^{-1}$)	0.64 \pm 0.07	0.59 \pm 0.04	0.65 \pm 0.04
$\mu_{\text{máx}}$ (d^{-1})	0.11 \pm 0.01	0.17 \pm 0.03**	0.12 \pm 0.01
t_d (d)	6.60 \pm 0.78	4.14 \pm 0.6**	5.74 \pm 0.56

Los valores con ** fueron significativamente distintos de acuerdo con la prueba de Tukey ($\mu_{\text{máx}}$: $F = 10.04$, $\rho < 0.05$; $\text{Tukey}_{0.05} = 0.045$; t_d : $F = 11.02$, $\rho < 0.01$; $\text{Tukey}_{0.05} = 1.631$).

La producción de glucósido de quercetina en la suspensión celular cultivada en el medio MS con 8.03 mM NO_3^- y 0.1 μM Cu^{2+} estuvo asociado al crecimiento celular. Tal como se determinó en la cinética de producción de activos en el medio MS basal, el glucósido de quercetina es un metabolito secundario constitutivo producido por las células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* (ver Figura 9). Por el contrario, en las condiciones de estimulación con 27.4 mM NO_3^- y 1.2 μM Cu^{2+} , la producción de escopoletina se indujo durante la fase de crecimiento logarítmico (7-19 días) y al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (Figura 13).

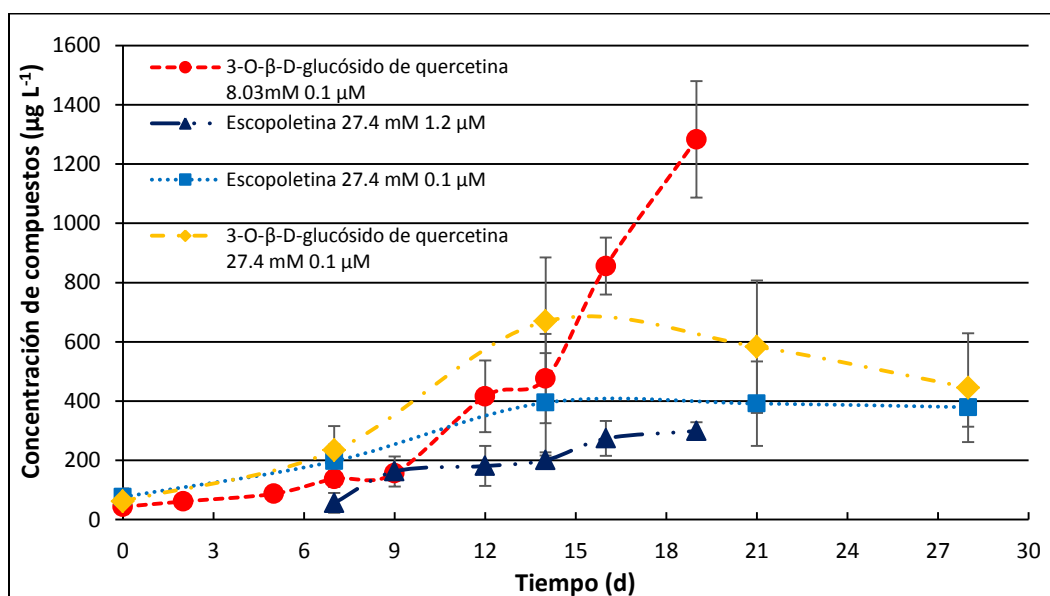


Figura 13. Cinéticas de producción de escopoletina y 3-O-β-D-glucósido de quercetina en los mejores tratamientos elegidos con la MSR y su comparación con el medio MS basal.

La máxima producción y los rendimientos máximos de los compuestos en las condiciones nutricionales determinadas en el DCC (14 días) y en las cinéticas en lote (19 días), se compararon con los obtenidos en el medio MS completo (14 días) empleando un ANOVA (Tabla 12). Como se mencionó anteriormente, la mayor producción de escopoletina obtenida en el DCC no es significativamente superior al determinado en el medio MS completo.

En cambio, la producción de 3-O-β-D-glucósido de quercetina fue significativamente incrementada al reducir el contenido de nitrato total en el medio MS a 8.03 mM. Los valores obtenidos con el análisis del modelo estadístico de la MSR confirman el óptimo crecimiento de la suspensión celular y de la estimulación en la producción del 3-O-β-D-glucósido de quercetina por el cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*. Estas condiciones de cultivo permitirían establecer un bioproceso a partir de la estimulación abiótica del cultivo *in vitro*, con la modificación de las concentraciones de nitratos totales y cobre para la producción de biomasa. Y posteriormente dirigirlo a la producción de escopoletina o de 3-O-β-D-glucósido de quercetina, con las mejores formulaciones de medios de cultivo determinados por el diseño estadístico de la MSR para cada uno de los compuestos activos. Este bioproceso podría ser escalado a nivel biorreactor y planta piloto para la producción de los compuestos de interés, hasta llegar a industrializar el bioproceso.

Tabla 12. Producción de compuestos activos en el medio MS completo en sales y en los mejores medios obtenidos con la MSR.

Producción de compuestos	Tratamientos				
	27.4 mM NO ₃ ⁻ , 0.1 μM Cu ²⁺ 14 días	27.4 mM NO ₃ ⁻ , 1.2 μM Cu ²⁺		8.03 mM NO ₃ ⁻ , 0.1 μM Cu ²⁺	
		14 días	14 días	19 días	14 días
Escopoletina (μg L ⁻¹)	394.78 ± 167.22 ^{BA}	567.55 ± 66.07 ^A	299.05 ± 29.74 ^B	NA	NA
3-O-β-D-glucósido de quercetina (μg L ⁻¹)	947.70 ± 14.43 ^C	NA	NA	1612.45 ± 80.73 ^A	1283.06 ± 196.81 ^B
Escopoletina (μg g _{PS} ⁻¹)	18.28 ± 7.26 ^B	31.2 ± 4.15 ^A	16.78 ± 1.48 ^B	NA	NA
3-O-β-D-glucósido de quercetina (μg g _{PS} ⁻¹)	44.95 ± 3.15 ^B	NA	NA	69.95 ± 2.73 ^A	68.38 ± 9.71 ^A

Valores con letras distintas fueron significativamente distintos de acuerdo con la prueba de Tukey (escopoletina: F = 5.02, $\rho < 0.05$, Tukey_{0.05} = 4.334; glucósido de quercetina: F = 21.87, $\rho < 0.01$, Tukey_{0.05} = 4.339; rendimiento escopoletina: F = 7.85, $\rho < 0.05$, Tukey_{0.05} = 12.278; rendimiento glucósido de quercetina: F = 15.81, $\rho < 0.01$, Tukey_{0.05} = 15.281). NA: no analizado.

8.3 Extracto metanólico y fracciones activas del cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*

Del extracto metanólico (TaM) de la biomasa de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* se obtuvo un rendimiento del 18.5%, porcentaje que se encuentra dentro de los rendimientos reportados para los extractos metanólicos de suspensiones celulares de otras especies como *Buddleja cordata* (Guitérrez-Rebolledo et al., 2018), *Waltheria americana* (Mundo et al., 2017), *Hypericum perforatum* (Pasqua et al., 2003) y *Aristolochia manshuriensis* (Bulgakov et al., 1996).

Las fracciones resultantes de la separación del extracto TaM se analizaron por CCF y se compararon con estándares de compuestos de tipo fenólico (cumarinas escopoletina, esculina, esculina y el flavonoide 3-O- β -D-glucósido de quercetina). Se observaron compuestos con fluorescencia bajo luz UV de onda larga ($\lambda = 365$ nm) y un r_f similar al de los estándares de referencia en todas las fracciones. En la fracción TaM-2 eluída en el sistema 9:1 H₂O:CH₃CN en silica gel (Figura 14-A2), se observaron compuestos con un r_f similar al de escopoletina ($r_f = 0.88$) y esculina ($r_f = 0.42$).

Del fraccionamiento químico de la fracción TaM-2 (2.1 g, columna 2) se obtuvieron 17 subfracciones (ver Tabla 5), cuyo análisis por CCF mostró la presencia de compuestos de posible naturaleza cumarínica en las subfracciones TaMC2-5 (subfracciones 21 a 23), TaMC2-9 (subfracción 30) y TaMC2-13 (subfracción 37 a 43). Las subfracciones TaMC2-5 y TaMC2-9 presentaron compuestos con valores de r_f (0.4 y 0.49) y fluorescencia bajo luz UV de onda larga ($\lambda = 365$ nm, Figura 15) similares a los de esculina ($r_f = 0.29$) y esculina (0.45), y la subfracción TaMC2-13 un compuesto ($r_f = 0.12$) similar a la escopoletina ($r_f = 0.13$).

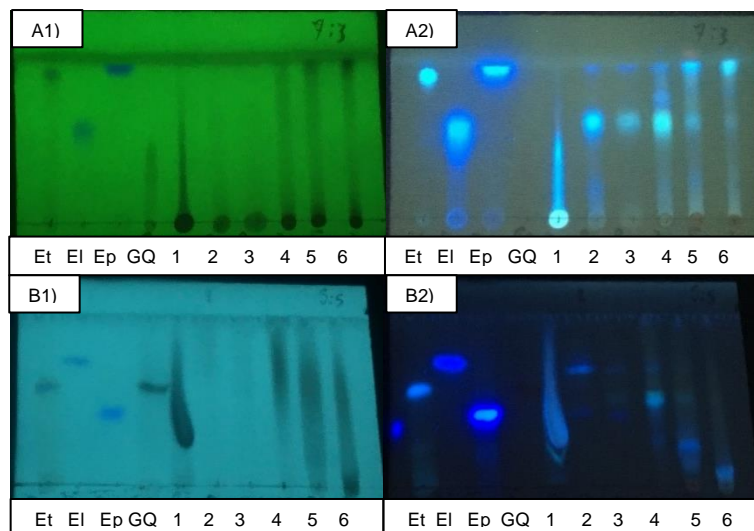


Figura 14. Cromatoplasmas de silica gel (A) y silica gel RP-18 (B) de las fracciones del extracto metanólico TaM de la biomasa de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* observadas a $\lambda = 254$ nm (1) y $\lambda = 365$ nm (2). Sistemas de elución: A) $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (7:3) y B) $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (5:5). Estándares de esculetina (Et), esculina (EI), escopoletina (Ep) y 3-*O*- β -D-glucósido de quercetina (GQ). 1: fracción TaM-1, H_2O (100%); 2: fracción TaM-2, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (9:1); 3: fracción TaM-3, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (8:2); 4: fracción TaM-4, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (7:3); 5: fracción TaM-5, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (5:5); 6: fracción TaM-6, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (3:7).

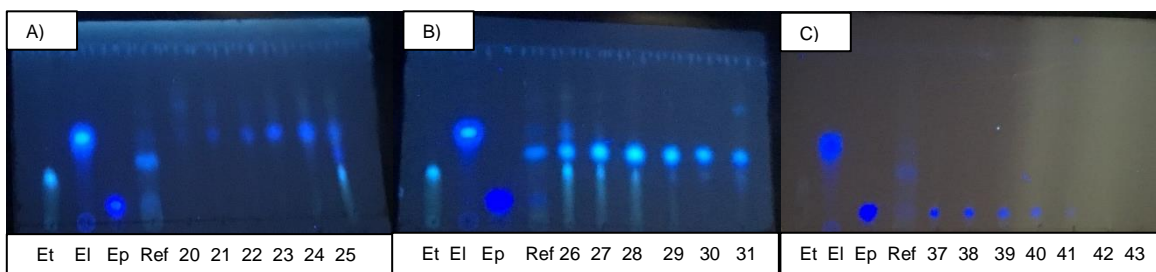


Figura 15. Cromatoplasmas de silica gel RP-18 con las subfracciones obtenidas de la fracción TaM2 observadas a $\lambda = 365$ nm. Sistema de elución $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (7:3). Estándares de esculetina (Et), esculina (EI), escopoletina (Ep). Ref: Referencia de la fracción TaM-2; A): fracciones TaMC2-4, TaMC2-5 y TaMC2-6 (alícuotas 20 a 25) eluidas con el sistema $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (9:1); B) fracción TaMC2-7 (alícuotas 26 a 28) eluída con $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (9:1) y fracciones TaMC2-8 (alícuota 29), TaMC2-9 (30) y TaMC2-10 (31) eluidas con $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (85:15); C) fracción TaMC2-13 (alícuotas 37 a 43) eluída con $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (80:20).

8.3.1 Identificación de esculina y esculetina en las fracciones derivadas del extracto metanólico TaM

El análisis por CLAR de la fracción TaMC2-5 (51.8 mg) obtenida del fraccionamiento de la subfracción TaM-2 derivada extracto metanólico TaM (ver Tabla 5), permitió conocer que dicha fracción está conformada por lo menos por dos compuestos con tiempos de retención de 8.5 y 9.1 min. La comparación de los espectros de UV y máximas longitudes de onda de absorción ($\lambda = 335$ y 347 nm, respectivamente) con los estándares comerciales de esculina, esculetina y escopoletina ($\lambda = 336$, 344 y 339 nm, respectivamente), así como de sus tiempos de retención ($t_r = 8.5$, 9.07 y 10.1 min, respectivamente) permitieron identificar que las señales presentes en dicha fracción corresponden a las cumarinas conocidas como esculina y esculetina (Figura 16).

En el cromatograma de la fracción TaMC2-9 (16.6 mg, ver Tabla 5), se observó la presencia de cinco señales con tiempos de retención que van de los 8.6 a 9.4 min. Aquellas pertenecientes a los compuestos 3 y 6 ($t_r = 8.6$ y 9.2 min) fueron comparadas con las de los compuestos 1 (esculina) y 2 (esculetina) de la fracción TaMC2-5, encontrando semejanza entre ellas por los espectros de UV y longitud de onda de máxima absorción ($\lambda = 343$ y 345 nm), por lo que los compuestos que integran ambas fracciones corresponden a la esculina y la esculetina. En la fracción TaMC2-13 (229.4 mg) se observaron dos señales ($t_r = 8.6$ y 10.2 min), encontrando que el compuesto 9 ($\lambda = 206$, 226 , 310 nm) corresponde a la escopoletina (Figura 17).

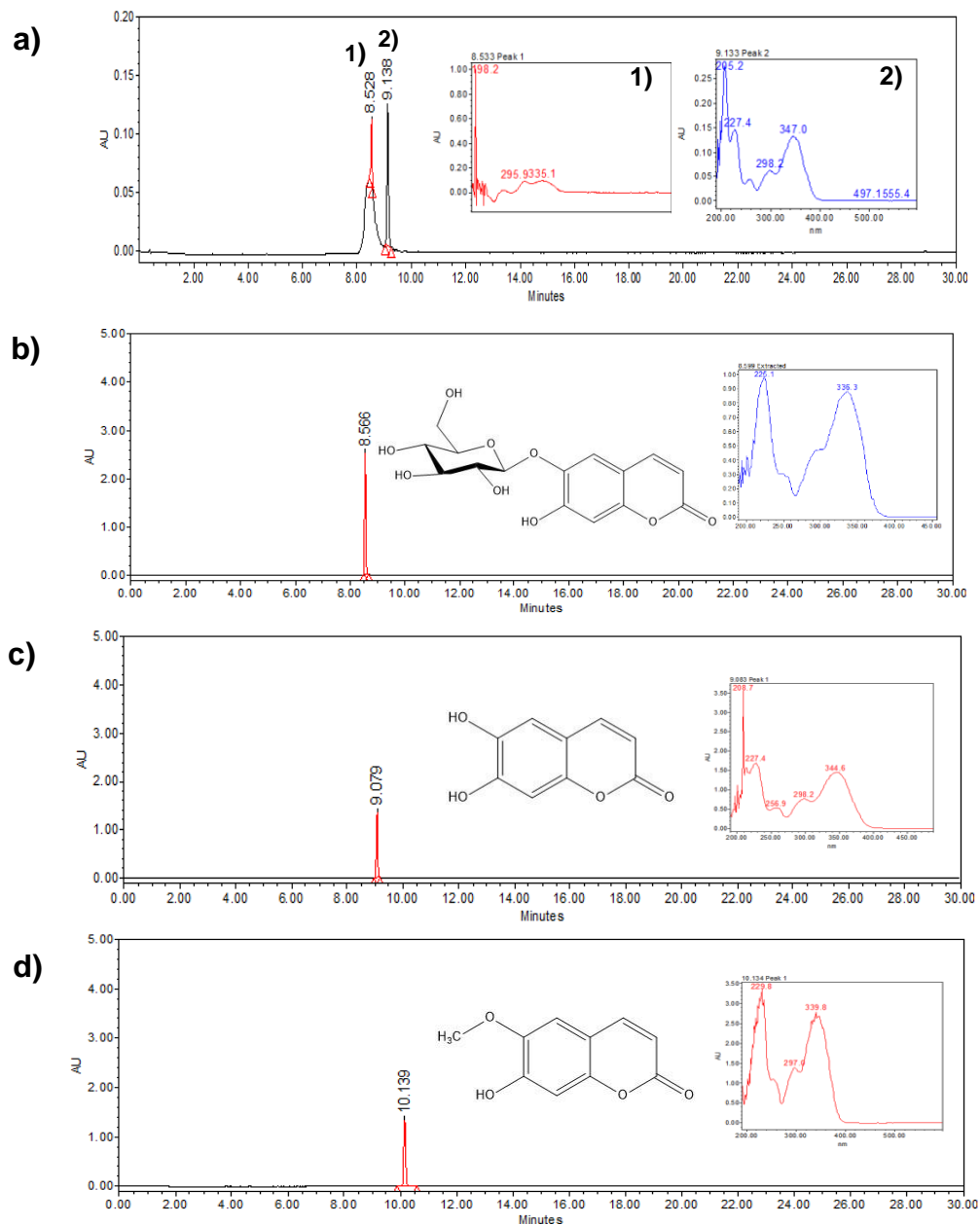


Figura 16. Cromatogramas y espectros de absorción de los compuestos identificados en la fracción TaMC2-5 (a) y de los estándares comerciales esculetina (b), esculetina (c) y escopoletina (d) observados a $\lambda = 344$ nm.

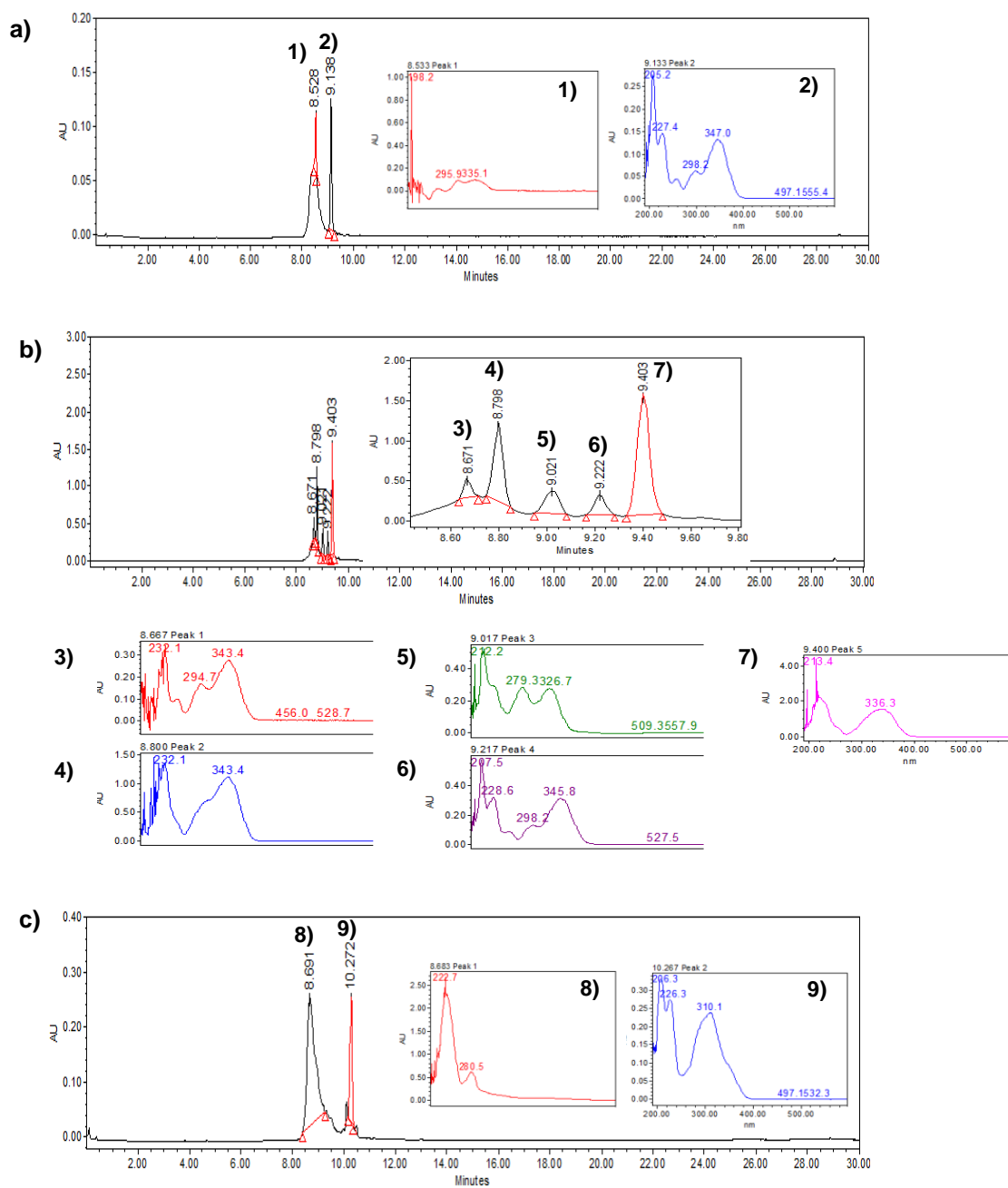


Figura 17. Cromatogramas y espectros de absorción de los compuestos identificados en las subfracciones derivadas de la fracción TaM-2 analizadas por CLAR: a) TaMC2-5, b) TaMC2-9, c) TaMC2-13.

8.3.2 Identificación de escopoletina en la subfracción TaMC2-13

El cromatograma obtenido por CLAR de la subfracción TaMC2-13 mostró una mezcla de compuestos: el compuesto mayoritario fue el 8, aún sin identificar. El tiempo de retención ($t_r = 10.2$ min) y espectro de UV ($\lambda = 206.3, 226.3, 310.1$ nm) del compuesto 9 se compararon con los del estándar de escopoletina, ($t_r = 10.13$ min, $\lambda = 229.8, 297, 339.8$ nm). De la purificación de esta subfracción (43.9 mg) mediante partición con agua y diclorometano, el análisis por CLAR de la fase orgánica (TaMC2D, 2 mg mL^{-1}) confirmó la presencia de escopoletina ($\lambda = 343.4$ nm, $t_r = 10.17$ min, Figura 18a); mientras que en la fase de acetato de etilo (TaMC2ACoEt) se identificó por CLAR un compuesto con $\lambda = 280.5$ nm y tiempo de retención de 8.66 min (Figura 18b), que no fue identificado.

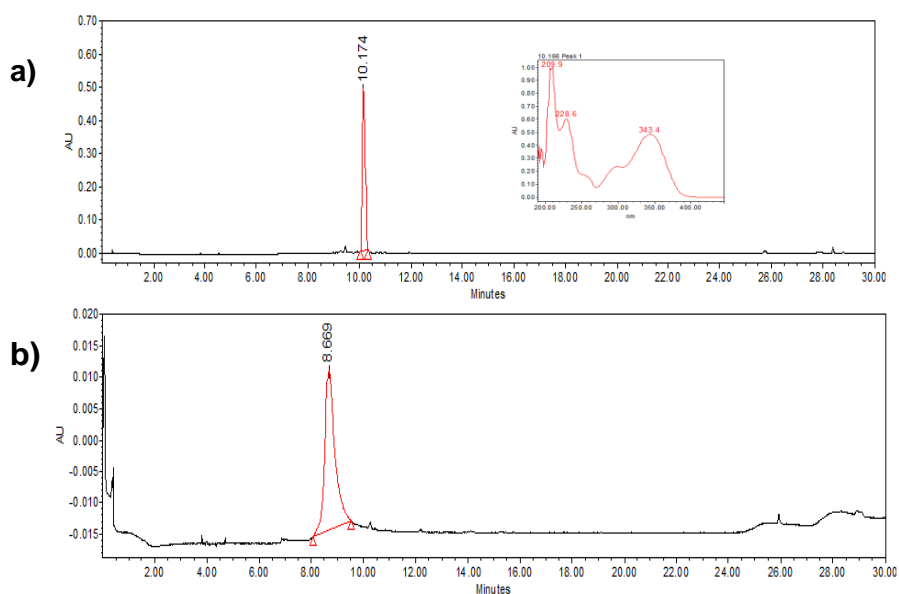


Figura 18. Cromatogramas y espectro de absorción de las subfracciones (a) TaMC2D y (b) TaMC2ACoEt observados a 344 y 330 nm, respectivamente.

El resto de la subfracción TaMC2-13 (185.5 mg) se particionó con un sistema 50:50 $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$; del proceso de purificación de la subfracción TaMC2D2 (29.3 mg) se obtuvieron 9 fracciones eluidas. El análisis por CCF antes de su reunión demostró la presencia de escopoletina ($r_f = 0.78$) en las alícuotas 1 y 2 ($r_f = 0.76$, TaMC2D2-1) y un compuesto ($r_f = 0.66$, TaMC2D2-3) cuya fluorescencia bajo luz UV de onda larga es similar al de esculetina, ($r_f = 0.68$) y eluye en las alícuotas 7 y 8 (Figura 19).

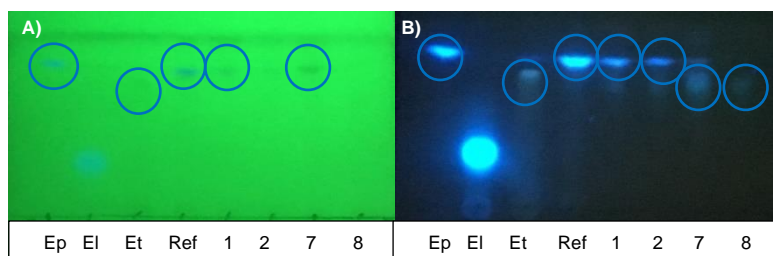


Figura 19. Cromatopla de fase normal de las fracciones obtenidas de la fracción TaMC2D2 observadas a 254 nm (A) y 365 nm (B). Sistema de elución CH_2Cl_2 :MeOH (9:1). Estándares de escopoletina (Ep), esculina (El), esculetina (Et). Ref: referencia de la subfracción TaMC2D2. 1 y 2: fracciones eluidas con CH_2Cl_2 (100%); 7 y 8: fracciones eluidas con CH_2Cl_2 (100%) y CH_2Cl_2 :MeOH (95:5) respectivamente.

Una vez reunidas, las subfracciones obtenidas de la TaMC2D2 se analizaron por CLAR (ver Tabla 7). La escopoletina se observó en la subfracción TaMC2D2-1 ($t_r = 10.22$ min, $\lambda = 344$ nm); la fracción TaMC2D2-3 está integrada por cuatro compuestos cuyos tiempos de retención van de los 9.7 a los 13.7 min, y sus espectros de UV son característicos de compuestos derivados del ácido gálico; en tanto que, la fracción TaMC2D2-6 está integrada por tres compuestos cuyos tiempos de retención son cercanos entre sí (9.88 a 10.35 min), donde el compuesto mayoritario es el compuesto 6, identificado como ácido *p*-cumárico al comparar sus respectivos tiempo de retención y espectro de absorción UV (10.15 min, $\lambda = 307.7$ nm) con los del estándar comercial ($\lambda = 310$ nm, $t_r = 10.22$ min; Figura 20).

En un trabajo preliminar, Gutiérrez-Almanza (2015) reportó la presencia de la escopoletina en el extracto metanólico de callos derivados de explantes de hoja con la misma concentración hormonal que se utilizó en este trabajo (2.0 mg L^{-1} de 2,4-D y 0.5 mg L^{-1} de KIN), pero no reportó la presencia del ácido *p*-cumárico. De la misma manera Flores-Sánchez et al. (2019) identificaron y cuantificaron escopoletina en los extractos metanólicos de las hojas de estacas obtenidas de árboles silvestres de *T. americana* var. *mexicana* ($11.3 \pm 0.42 \mu\text{g g}_{\text{PS}}^{-1}$), contenido que fue similar al cuantificado en callos derivados de explantes de yemas apicales cultivados con 0.005 mg L^{-1} de TDZ más 0.1 mg L^{-1} de AIB ($7.64 \pm 2.3 \mu\text{g g}_{\text{PS}}^{-1}$). El contenido de escopoletina que reportaron fue similar al obtenido en los tratamientos estimulados con 41.1 mM de NO_3^- en combinación con $0.01 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ($6.35 \pm 0.49 \mu\text{g g}_{\text{PS}}^{-1}$) ó $1 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ($8.35 \pm 1.026 \mu\text{g g}_{\text{PS}}^{-1}$), y mayor en el

tratamiento con 27.4 mM NO₃⁻ y 1.2 μM Cu²⁺ (28.78 ± 4.29 μg g_{PS}⁻¹, ver Tabla 9) que lo reportado por Flores-Sánchez et al. (2019) en los callos de yemas apicales y hojas de la planta. La escopoletina se ha reportado en otras especies de la familia Tiliaceae, como en hojas y frutos de *T. cordata* (Manuele et al., 2006).

La escopoletina pertenece a un grupo de cumarinas simples derivadas de 1,2-benzopironas y originadas a partir de la ruta metabólica de los fenilpropanoides, en la cual, el ácido *p*-cumárico es un intermediario metabólico sintetizado a partir del ácido cinámico por acción de la enzima cinamato-4-hidroxilasa, y después transformado en ácido cafeico por la enzima cumarato 3-hidroxilasa o bien en ácido ferúlico por la enzima ácido cafeico 3-*O*-metiltransferasa; a partir de ambos compuestos se generan diversas cumarinas (Gnonlonfin et al., 2012). Se sabe, por ejemplo, que en raíces de cassava sometidas a investigaciones de deterioro *post*-cosecha, la escopoletina se forma principalmente a partir del ácido *p*-cumárico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico. Una vía alterna a través del 2',4'-dihidroxicinamato y umbeliferona llevan a la síntesis de esculina (6-glucósido de esculetina) y la esculetina (6,7-dihidroxicumarina) en raíces de cassava (Bayoumi et al., 2008; Gnonlonfin et al., 2012).

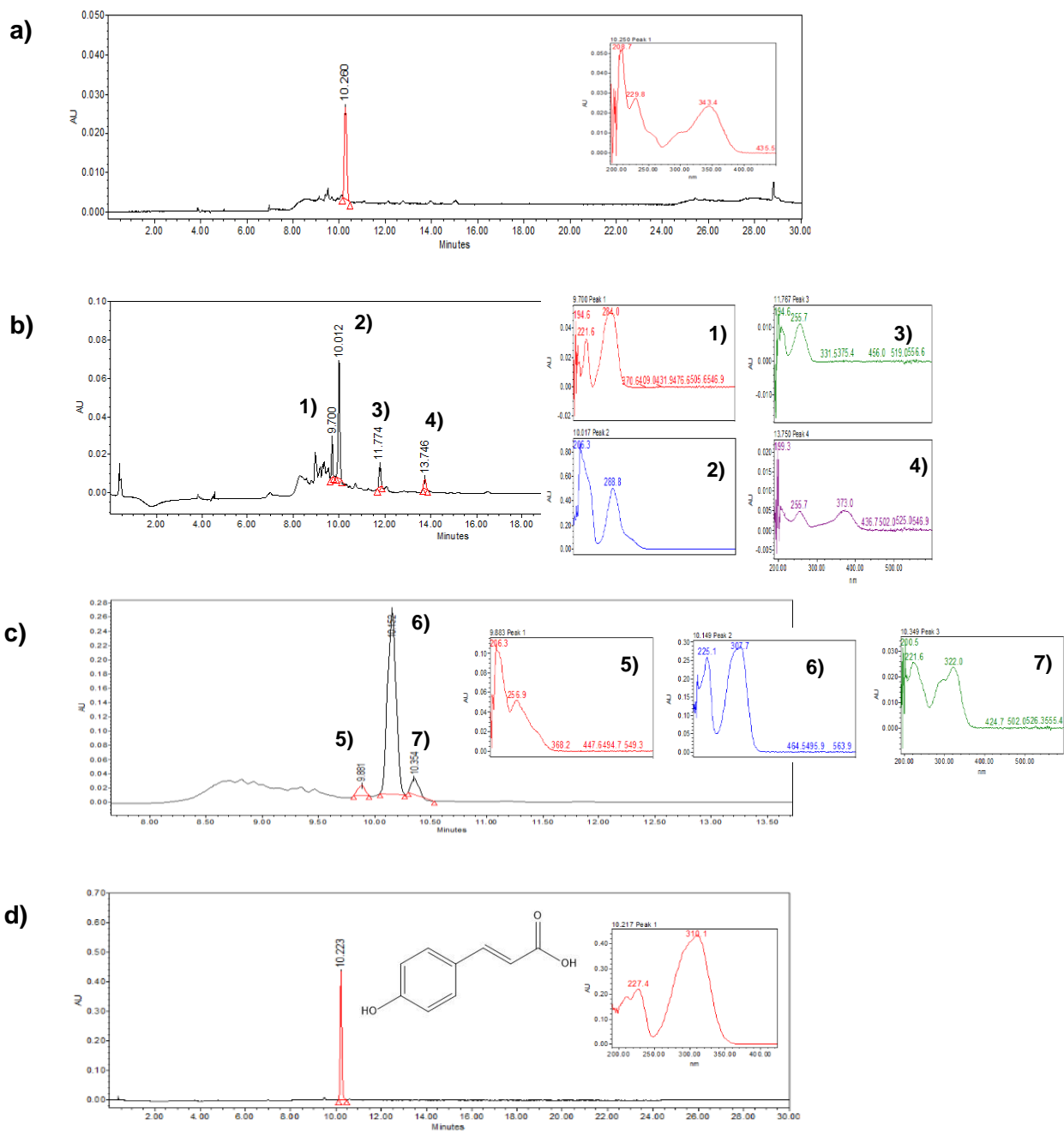


Figura 20. Cromatogramas y espectros de absorción de las subfracciones derivadas de TaMC2D2: (a) TaMC2D2-1, 344 nm; (b) TaMC2D2-3, 310nm; (c) lavado TaMC2D2-6, 310nm; (d) estándar de ácido *p*-cumárico, $\lambda = 310$ nm.

8.3.3 Efecto gastroprotector del extracto metanólico y fracciones del cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*

La actividad gastroprotectora del extracto metanólico íntegro y de las fracciones derivadas TaMC2-5 y TaMC2-9 ricas en cumarinas, se determinó en el modelo murino de úlceras inducidas con etanol absoluto. El etanol causó edemas, hemorragias, ulceraciones y erosiones en los estómagos de los ratones en un 49% (Figura 21b). Los ratones tratados con el extracto TaM y la fracción TaMC2-9 presentaron estómagos con menor área ulcerada, al compararse con el control negativo, y áreas lesionadas inferiores comparadas con el fármaco famotidina (Tabla 13). Los estómagos tratados con el extracto TaM y la fracción TaMC2-9 mostraron menor formación de lesiones gástricas producidas por la administración de etanol, observándose zonas con edema en los pliegues del fondo gástrico (Figura 21c y 21d).

Tabla 13. Efecto gastroprotector del extracto metanólico (TaM) y sus fracciones sobre la formación de úlceras inducidas con etanol en ratón.

Tratamientos	Índice de ulceración (%)	Porcentaje de Protección (%)
Control negativo	49.15 ± 12.90	—
Control positivo	31.83 ± 1.81	32.63 ± 3.68*
Extracto TaM	7.80 ± 3.25**	70.14 ± 19.33**
Fracción TaMC2-5	39.70 ± 20.26	6.26 ± 3.20
Fracción TaMC2-9	12.77 ± 4.02**	78.27 ± 11.88**

Índice de ulceración: Media ± D.E., n = 5, F = 8.83, $p > 0.0006$, de acuerdo con la prueba de Dunnet_{0.05} = 2.73; los datos con ** son estadísticamente diferentes al control negativo.

Porcentaje de protección: Media ± D.E., n = 5, F = 15.25, $p > 0.0005$, de acuerdo con la prueba de Tukey_{0.05} = 4.33; los datos con ** mostraron diferencia significativa.

De la misma manera, el efecto gastroprotector determinado en los ratones tratados con el extracto TaM y la fracción TaMC2-9 a las dosis evaluadas de 100 mg kg⁻¹ y 10 mg kg⁻¹, respectivamente, fue similar entre sí. Los estómagos conservaron su integridad al ser abiertos por la curvatura mayor, mostraron pocas zonas con inflamación, sin hemorragias, observándose áreas rosáceas donde la mucosa gástrica no sufrió daño considerable. La alta concentración de etanol puede corroer directamente los tejidos de la mucosa gástrica, causando inflamación aguda, hiperemia, edema, hemorragia, erosión y ulceración (Rocco et al., 2014). El etanol puede causar daño a la mucosa gástrica por incremento de los factores de daño de la misma, debilitamiento de los factores de

protección además de sobrecarga de calcio en las células (Lieber, 1997). Por otra parte, el etanol absorbido por el estómago es metabolizado en acetaldehído por la alcohol deshidrogenasa y en radicales libres (EROs) por la xantina oxidasa, los cuales tienen un papel muy importante en el proceso de lesión del tejido gástrico (Haorah et al., 2008). Las EROs incrementan la reacción de peroxidación lipídica celular, mientras que las células endoteliales capilares son dañadas, causando una mayor permeabilidad (Kwiecien et al., 2014). El etanol puede causar reacciones de oxidación en las células, cambio de permeabilidad mitocondrial y despolarización mitocondrial, que acelera la muerte de las células de la mucosa gástrica (Singh et al., 2014). El efecto gastroprotector mostrado por ambos tratamientos podría deberse al contenido de compuestos fenólicos; el TaM es rico en el flavonoide 3-O- β -D-glucósido de quercetina, además de estar integrado por las cumarinas escopoletina, esculina y esculetina, en tanto que la fracción TaMC2-9 está integrada por las cumarinas esculina y esculetina. La fracción TaMC2-9 también contiene otros compuestos aún no identificados (Figura 21b). Por el contrario, en la fracción TaMC2-5 (Figura 21d) el contenido de esculina y esculetina es menor al de la fracción TaMC2-9 y no se observó un efecto gastroprotector importante.

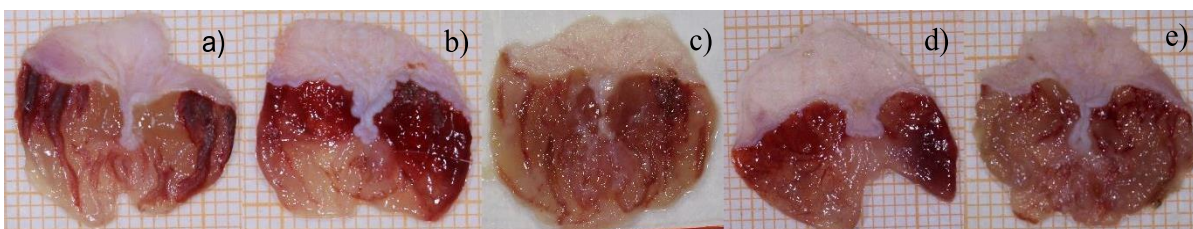


Figura 21. Efecto gastroprotector del extracto metanólico TaM (c) y las fracciones TaMC2-5 (d) y TaMC2-9 (e) comparados con la famotidina (a) y el vehículo (b).

En este trabajo se describe por primera vez el efecto gastroprotector del extracto metanólico de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*, especie reportada en la medicina tradicional para tratar padecimientos asociados a la inflamación y no existe información respecto a su uso para el tratamiento de úlceras gástricas. Por tanto, es la actividad antiinflamatoria que da sustento científico a la actividad gastroprotectora de la planta evaluada en este trabajo, debido a que el proceso ulcerogénico está asociado con un proceso inflamatorio, donde pueden participar las EROs, citocinas pro-inflamatorias

como el factor de necrosis tumoral TNF- α y las interleucinas (IL) IL-1 β e IL-6, además de mediadores proinflamatorios como la prostaglandina PGE₂ y el óxido nítrico generado por la óxido nítrico sintasa inducible (Boron y Boulpaep, 2017; Mahattanadul et al., 2011; Holzer, 2001; Oh et al., 2001). En un estudio preliminar se evaluaron los extractos metanólicos de callos derivados de yemas apicales y de hojas de estacas, obtenidas de árboles silvestres de *T. americana* var. *mexicana* en un modelo de edema auricular inducido con TPA; en este estudio se reportó que dichos extractos fueron capaces de reducir el edema con una DE₅₀ de 1.73 y 0.38 mg/oreja para el extracto de callos y hojas, respectivamente (Flores-Sánchez et al., 2019). La actividad antiinflamatoria fue atribuida a la escopoletina, la cual se ha evaluado en diversos modelos de inflamación (Pan et al., 2010).

En un trabajo reportado por Mahattanadul et al. (2011) se evaluó el extracto hidroalcohólico (AFE) de frutos de *Morinda citrifolia*, identificando escopoletina en el mismo. El compuesto puro, evaluado a una dosis equivalente a la cuantificada en el extracto AFE (1 mg/Kg), mostró actividades antiselectoras y antiulcerogénicas similares al extracto AFE excepto que la escopoletina mostró menor actividad procinética. Los autores concluyeron que la escopoletina puede ser benéfica como agente terapéutico para enfermedades inflamatorias gastroesofágicas, principalmente a través de sus actividades procinéticas y antiselectoras, incluyendo una actividad neutralizante de radicales libres y anti-inflamatoria mediada por citocinas, y gastroprotectora ya que esta cumarina podría inhibir a la enzima H⁺/K⁺-ATPasa, paso final de la secreción ácido-gástrica (Mahattanadul et al., 2011, Reyes-Chilpa et al., 2006).

Tanto la escopoletina como las cumarinas en general han demostrado poseer actividades antiinflamatorias, reduciendo el edema en los tejidos debido a diversos estímulos. Por ejemplo, la escopoletina purificada de los extractos hidroalcohólicos de tallos de *Erycibe obtusifolia* demostró efecto antiartrítico vía intraperitoneal a las concentraciones de 50 y 10 mg kg⁻¹ en ratas. Las cumarinas poseen actividad antioxidante y la ya mencionada habilidad de eliminar radicales peroxilo. Además, las cumarinas afectan las vías de biosíntesis de prostaglandinas y ácidos hidroperoxieicosatetranoicos, al inhibir la actividad de las enzimas COX y LOX, respectivamente que participan en sus biosíntesis a través del metabolismo del ácido araquidónico (Fylaktakidou et al, 2004; Hoult et al., 1996; Payá et al., 1994). Kim et al. (2004) demostraron que la escopoletina inhibe la biosíntesis de la prostaglandina PGE₂, el factor de necrosis tumoral alfa TNF- α y las interleucinas

proinflamatorias IL-1 β e IL-6; además de suprimir la expresión de la isoforma 2 de la COX-2 a una concentración dosis dependiente (1-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), en un modelo *in vitro* de inflamación utilizando macrófagos de la línea RAW 264.7 estimuladas con interferón γ (IFN- γ) y lipopolisacárido (LPS). Por otra parte, Keizo et al. (1982) probaron que la esculetina inhibe la actividad de las enzimas LOX y la COX en plaquetas de rata, mostrando una inhibición no competitiva superior hacia la LOX que de la COX, con base en los valores de concentración inhibitoria media (IC_{50}) de 0.65 μM para la LOX y de 0.45 μM para la COX. La esculina presentó una actividad inhibitoria selectiva a la LOX ($\text{IC}_{50} = 290 \mu\text{M}$) e inferior a la determinada para la esculetina.

IX. CONCLUSIONES

- Los parámetros cinéticos de crecimiento ($B_{m\acute{a}x}$, I_c , t_d , $\mu_{m\acute{a}x}$) del cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* son similares a los reportados para otras especies leñosas.
- La producción de escopoletina y de 3-O- β -D-glucósido de quercetina está asociada al crecimiento en el cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*, cultivada en lote en el medio de Murashige y Skoog con las concentraciones basales de nitratos (27.4 mM) y cobre (0.1 μ M).
- De acuerdo con el Diseño Factorial 2^K se determinó que el crecimiento del cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana* se optimiza al reducir el contenido de nitratos totales a 13.7 mM en combinación con 1 μ M de cobre.
- Se determinó que la producción de 3-O- β -D-glucósido de quercetina es característica a la de un metabolito constitutivo, asociado al crecimiento; en tanto que la cumarina escopoletina es inducible y su estimulación es típica a la de las fitoalexinas.
- La producción de escopoletina se estimuló al incrementar la concentración de cobre a 1.2 μ M, por lo que es un metabolito inducible ya que no se le cuantificó sino hasta el séptimo día de iniciado el cultivo, y su producción fue aproximadamente tres veces mayor con respecto a la obtenida en el medio MS basal.
- La producción de 3-O- β -D-glucósido de quercetina fue estimulada por la reducción del contenido total de nitratos a 8.03 mM en combinación con 0.1 μ M de cobre, su producción fue aproximadamente tres veces mayor con respecto a la obtenida en el medio MS basal.
- La modificación de la concentración de los estimuladores abióticos, nitratos y cobre, en el medio de cultivo favoreció la producción de compuestos activos, al causar un estrés nutricional a los cultivos de células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana*.

- El diseño estadístico de la MSR permitió determinar una condición óptima para el crecimiento de la suspensión celular a partir de establecer distintos niveles de los estimuladores abióticos NO_3^- y Cu^{2+} , así como dirigir la producción de escopoletina o 3-O- β -D-glucósido de quercetina con dos condiciones distintas de producción, mismas que podrían ser llevadas a nivel de biorreactor en dos etapas para escalar la producción de cada compuesto.
- El extracto metanólico de células en suspensión es rico en cumarinas como escopoletina, esculina y esculetina.
- El extracto metanólico (100 mg kg^{-1}) y la fracción TAMC2-9 integrada por esculina y esculetina (10 mg kg^{-1}) mostraron un efecto gastroprotector similar a las concentraciones evaluadas.

X. PERSPECTIVAS

- Evaluar estimuladores bióticos como el metil jasmonato en la producción de escopoletina, 3-O- β -D-glucósido de quercetina y tilirósido en las suspensiones celulares de *Tilia americana* var. *mexicana* en lote en matraz agitado.
- Establecer las condiciones de operación de un biorreactor con agitación mecánica (velocidad de agitación, aireación y tipo de impulsor) para el crecimiento del cultivo de células en suspensión de *T. americana* var. *mexicana*.
- Caracterizar la producción de escopoletina o 3-O- β -D-glucósido de quercetina de un cultivo de *T. americana* var. *mexicana* en biorreactor de tanque agitado.
- Purificar e identificar por los compuestos presentes en la fracción con actividad gastroprotectora y evaluar de manera individual su efecto gastroprotector, en un modelo de úlceras inducidas con etanol absoluto en ratón.
- Realizar el análisis de las citocinas pro- y anti-inflamatorias de los estómagos de los ratones tratados con el extracto metanólico y la fracción TaMC2-9 para elucidar de manera molecular el efecto gastroprotector presentado.

XI. REFERENCIAS

Aguilar A., Camacho J.R., Chino S., Jacquez P., López M.E. (1994). Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social; México. p. 218.

Adame J., Adame H. (2000). *Plantas Curativas del Noreste Mexicano*. Ediciones Castillo, Monterrey, México, p. 386.

Aguirre-Hernández E., González-Trujano M., Martínez A., Moreno J., Kite G., Terrazas T., Soto-Hernández M. (2010). HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* L. var. *mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 127:91–97. DOI: 10.1016/j.jep.2009.09.044.

Aguirre-Hernández E., González-Trujano M.E., Terrazas T., Herrera-Santoyo T., Guevara-Fefer P. (2016). Anxiolytic and sedative-like effects of flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*: GABAergic and serotonergic participation. *Salud Mental*, 39:37–46. DOI: 10.17711/SM.0185-3325.2015.066.

Aguirre-Hernández E., Martínez A., González-Trujano M., Moreno J., Vibrans H., Soto-Hernández M. (2007). Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 109:140–145. DOI: 10.1016/j.jep.2006.07.017.

Al-Harbi M.M., Qureshi S., Raza M., Ahmed M.M., Afzal M., Shah A.H. (1997). Gastric antiulcer and cytoprotective effect of *Commiphora molmol* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 55(2): 141–150. DOI: 10.1016/S0378-8741(96)01488-2.

Ali M.B., Hahn E.J., Paek K.Y. (2006). Copper-induced changes in the growth, oxidative metabolism, and saponin production in suspension culture roots of *Panax ginseng* in bioreactors. *Plant Cell Reports*, 25(10):1122–1132. DOI: 10.1007/s00299-006-0174-x.

Altinier G., Sosa S., Aquino R.P., Mencherini T., Loggia R.D., Tubaro A. (2007). Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5):1718–1723. DOI: 10.1021/jf062610+.

Amaral G.P., de Carvalho N.R., Barcelos R.P., Dobrachinski F., de Lima Portella R., da Silva M.H., Lugokenski T.H., Mundstock-Dias G.R., Almedia da Luz S.C., Augusti-Boligon A., Athayde M.L., Villetti M.A., Antunes-Soares F.A., Fachineto R. (2013). Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 55:48–55. DOI: 10.1016/j.fct.2012.12.038.

Andújar I., Recio M.C., Bacelli T., Giner R. M., Ríos J.L. (2010). Shikonin reduces oedema induced by phorbol ester by interfering with I κ B α degradation thus inhibiting translocation of NF- κ B to the nucleus. *British journal of pharmacology*, 160(2): 376–388. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00696.x.

Ángeles-López G.E., González-Trujano M.E., Déciga-Campos M., Ventura-Martínez R. (2013). Neuroprotective evaluation of *Tilia americana* and *Annona diversifolia* in the neuronal damage induced by intestinal ischemia. *Neurochemical Research*, 38:1632–1640. DOI: 10.1007/s11064-013-1065-5.

Ángeles-López G.E., González-Trujano M.E., Gómez C., Chánez-Cárdenas M.E., Ventura-Martínez R. (2015). Neuroprotective effects of *Tilia americana* var. *mexicana* on damage induced by cerebral ischaemia in mice. *Natural Product Research*, 30:2115–2119. DOI: 10.1080/14786419.2015.1110701.

Argueta A., Cano L., Rodarte M. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo III. Instituto Nacional Indigenista; México, p. 1337.

Azevedo H., Dias A., Tavares R.M. (2008). Establishment and characterization of *Pinus pinaster* suspension cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(1):115–121. DOI: 10.1007/s1124 0-008-9349-1.

Bayoumi SA, Rowan MG, Blagbrough IS, Beeching JR (2008). Biosynthesis of scopoletin and scopolin in cassava roots during post-harvest physiological deterioration: The E-Z isomerisation stage. *Phytochemistry*, 69(17): 2928–2936. DOI:10.1016/j.phytochem.2008.09.023.

Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escalera L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5):965–977. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.05.019.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana UNAM [en línea]. *Tilia mexicana* [consultado el 6 de febrero de 2016]. Universidad Nacional Autónoma de México. 2009. Disponible en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tilia&id=7788>.

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5):839–851. DOI: 10.1016/s0168-9452(01)00490-3.

Boligon A.A., de Freitas R.B., de Brum T.F., Waczuk E.P., Klimaczewski C.V., de Ávila D. S., Linde-Athayde M., de Freitas Bauermann L. (2014). Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(5): 358–367.

Bonilla I. (2013). Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En: Azcón-Bieto J., Talón M. (eds). *Fundamentos de Fisiología vegetal*, 2ª Ed. McGraw-Hill Interamericana de España, pp. 106-113.

Boron W.F., Boulpaep E.L. (2017). *Fisiología médica*. 3ª ed. Elsevier España, pp 863–878.

Borstnar C.R., Cardellach F. (2014). *Farreras-Rozman. Medicina Interna. Enfermedades del aparato digestivo. Gastroenterología y hepatología*. 17ª ed. Elsevier Health Sciences España, pp 35–45.

Bhojwani S.S., Dantu P.K. (2013). *Plant tissue culture: an introductory text*. Springer India. pp. 277-279 DOI: 10.1007/978-81-322-1026-9.

Bulgakov V., Zhuravlev Y.N., Radchenko S., Fedoreyev S., Denisenko V., Veselova M., Kulesh N., Alshevskaya E. (1996). Constituents of *Aristolochia manshuriensis* cell suspension culture possessing cardiotoxic activity. *Fitoterapia*, 67(3):238-240.

Chatterjee A., Bandyopadhyay S.K. (2014). Herbal remedy: An alternate therapy of nonsteroidal anti-inflammatory drug induced gastric ulcer healing. *Ulcers*, 2014: 1–13. DOI: 10.1155/2014/361586.

Chaturvedi M.M., Kumar A., Darnay B.G., Chainy G.B., Agarwal S., Aggarwal B.B. (1997). Sanguinarine (pseudochelethrythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation, and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48): 30129-30134. DOI: 10.1074/jbc.272.48.30129.

Chen C.T., Chen T.H., Lo K.F., Chiu C.Y. (2004). Effects of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress. *Plant Science*, 166(1):103–111. DOI: 10.1016/j.plantsci.2003.08.015.

Chen H., Yuan J.P., Chen F., Zhang Y.L., Song J.Y. (1997). Tanshinone production in Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *Journal of biotechnology*, 58(3): 147–156. DOI: 10.1016/S0168-1656(97)00144-2.

Chen S., Zhao X., Sun P., Qian J., Shi Y., Wang R. (2017). Preventive effect of *Gardenia jasminoides* on HCl/ethanol induced gastric injury in mice. *Journal of pharmacological sciences*, 133(1):1–8. DOI: 10.1016/j.jphs.2016.05.011.

Coleta M., Campos M., Cotrim M., Cunha, A. (2001). Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test. *Pharmacopsychiatry*, 34: 520-52. DOI: 10.1055/s-2001-15460.

De Lira Mota K.S., Dias G.E.N., Pinto M.E.F., Luiz-Ferreira Â., Monteiro Souza-Brito A.R., Hiruma-Lima C.A., Barbosa-Filho J.M., Batista, L. M. (2009). Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules*, 14(3):979–1012. DOI: 10.3390/molecules14030979.

Dias P.C., Foglio M.A., Possenti A., de Carvalho J.E. (2000). Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of ethnopharmacology*, 69(1): 57–62. DOI: 10.1016/S0378-8741(99)00133-6.

Erkan N., Ayranci G., Ayranci E. (2008). Antioxidant activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1): 76–82. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.01.058.

Fernandez M.T., Mira M.L., Florencio M.H., Jennings K.R. (2002). Iron and copper chelation by flavonoids: an electro spray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92:105–111. DOI: 10.1016/S0162-0134(02)00511-1.

Flores-Sánchez K., Cruz-Sosa F., Zamilpa-Alvarez A., Nicasio-Torres P. (2019). Active compounds and anti-inflammatory activity of the methanolic extracts of the leaves and callus from *Tilia americana* var. *mexicana* propagated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(1):55. DOI: 10.1007/s11240-018-01550-x.

Fritz C., Palacios N., Fiel R., Stitt M. (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant Journal*, 46(4):533–548. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02715.x.

Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaidis DN (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Current pharmaceutical design*, 10(30): 3813–3833. DOI: 10.2174/1381612043382710.

Fujita Y., Tabata M. (1987). En: Green C.E., Somers D.A., Hackett W.P., Biesbore D.D. (eds). *Plant Tissue and Cell Culture*, Alan R. Liss, New York, pp. 169–185.

Gilmour S.G. (2006). Response surface designs for experiments in bioprocessing. *Biometrics*, 62:323–331. DOI: 10.1111/j.1541-0420.2005.00444.x.

Gnonlonfin G.B., Sanni A., Brimer L. (2012). Review scopoletin –a coumarin phytoalexin with medicinal properties. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1): 47–56. DOI: 10.1080/07352689.2011.616039

Guerrero E., Abad A., Montenegro G., del Olmo E., López-Pérez J.L., San Feliciano A. (2013). Analgesic and anti-inflammatory activity of podophyllotoxin derivatives. *Pharmaceutical biology*, 51(5): 566–572. DOI: 10.3109/13880209.2012.749921.

Gutiérrez-Rebolledo G.A., Estrada-Zúñiga M.E., Nieto-Trujillo A, Cruz-Sosa F., Jiménez-Arellanes M.A. (2018). *In vivo* anti-inflammatory activity and acute toxicity of methanolic extracts from wild plant leaves and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth (Buddlejaceae). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1):317–330. DOI: 10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Gutierrez

Han J., Zhong J.J. (2002). High density cell culture of *Panax notoginseng* for production of ginseng saponin and polysaccharide in an airlift bioreactor. *Biotechnology letters*, 24(22): 1927–1930. DOI: 10.1023/A:1020960410885.

Hanchinal V.M., Survase S.A., Sawant S.K., Annapure U.S. (2008). Response surface methodology in media optimization for production of β -carotene from *Daucus carota*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(2):123–132. DOI: 10.1007/s11240-008-9350-8.

Haorah J., Ramirez S.H., Floreani N., Gorantla S., Morsey B., Persidsky Y. (2008). Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(11):1542–1550. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.030.

Hardin J.W. (1990). Variation patterns and recognition of varieties of *Tilia americana* sl. *Systematic Botany*, 15:33–48. DOI: 10.2307/2419014

Herrera-Ruiz M., Román-Ramos R., Zamilpa A., Tortoriello J., Jiménez-Ferrer E. (2008). Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus-maze test. *Journal of Ethnopharmacology*, 118:312–317. DOI: 10.1016/j.jep.2008.04.019.

Holzer P. (2001). Gastroduodenal mucosal defense: coordination by a network of messengers and mediators. *Current Opinion in Gastroenterology*, 17(6): 489–496.

Hoult J.R.S., Payá M. (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *General pharmacology: the vascular system*, 27(4): 713–722. DOI: org/10.1016/0306-3623(95)02112-4.

Hu Z., Zhou X., Guo J. (1995). Anticarcinogenic alkaloids in the cultured cells of *Cephalotaxus fortunei*. En: *Chinese Science Abstracts Series B*, Vol. 4, No. 14, p. 31.

Janas K.M., Amarowicz R., Zielińska-Tomaszewska J., Kosińska A., Posmyk M.M. (2009). Induction of phenolic compounds in two dark-grown lentil cultivars with different tolerance to copper ions. *Acta physiologiae plantarum*, 31(3): 587–595. DOI: 10.1007/s11738-008-0268-x.

Kahraman A., Erkasap N., Köken T., Serteser M., Aktepe F., Erkasap S. (2003). The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology*, 183(1–3): 133–142.

Karuppusamy S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell culture. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13): 1222–1239.

Karwasara V.S., Dixit V.K. (2012). Culture medium optimization for improved puerarin production by cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa* (Roxb. ex Willd.) DC. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(2): 189–199. DOI: 10.1007/s11627-011-9415-y.

Katoh S., Yoshida F. (2009). Cell kinetics in Biochemical engineering: a textbook for engineers, chemists and biologists. John Wiley & Sons, Germany pp 47-54.

Keizo S., Hiromichi O., Shigeru A. (1982). Selective inhibition of platelet lipoxigenase by esculetin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 713(1): 68–72. DOI: 10.1016/0005-2760(82)90167-9.

Kim H.J., Jang S.I., Kim Y.J., Chung H.T., Yun Y.G., Kang T.H., Jeon O.S., Kim Y.C. (2004). Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE₂ from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. *Fitoterapia*, 75(3–4): 261–266. DOI: 10.1016/j.fitote.2003.12.021.

Kinoshita M., Noto T., Tamaki H. (1995). Effect of a combination of ecabet sodium and cimetidine on experimentally induced gastric lesions and gastric mucosal resistance to ulcerogenic agents in rats. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 18(2):223–226. DOI: 10.1248/bpb.18.223.

Kodama T., Ishida H., Kokubo T., Yamakawa T., Noguchi H. (1990). Glucosylation of quercetin by a cell suspension culture of *Vitis sp.* *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(12):3283–3288. DOI: 10.1080/00021369.1990.10870473.

Kokubo T., Ambe Y., Nakamura M., Yamakawa T., Noguchi H., Kodama T. (1991). Quercetin 3--O- β -D-glucopyranoside and Isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside formation from quercetin by cell cultures of *Ipomoea batatas* and *Crocus sativum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(2):613–614. DOI: 10.1080/00021369.1991.10870595.

Koo O.M., Rubinstein I., Onyüksel H. (2010). Actively targeted low-dose camptothecin as a safe, long-acting, disease-modifying nanomedicine for rheumatoid arthritis. *Pharmaceutical Research*, 28(4): 776–787. DOI: 10.1007/s11095-010-0330-4.

Korsangruang S., Soonthornchareonnon N., Chintapakorn Y., Saralamp P., Prathanturarug S. (2010). Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(3):333–342. DOI: 10.1007/s11240-010-9785-6.

Kuo C.L., Chi C.W., Liu T.Y. (2004). The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* and *in vivo*. *Cancer letters*, 203(2): 127–137. DOI: 10.1016/j.canlet.2003.09.002.

Kwiecien S., Jasnos K., Magierowski M., Sliwowski Z., Pajdo R., Brzozowski B., Mach T., Wojcik D., Brzozowski T. (2014). Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress-induced gastric injury. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 65(5):613–622.

Lanas A., Chan F.K.L. (2017). Peptic ulcer disease. *The Lancet*, 390(10094):613-624. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32404-7.

Lee B., Sur B., Shim I., Lee H., Hahm D.H. (2012). *Phellodendron amurense* and its major alkaloid compound, berberine ameliorates scopolamine-induced neuronal impairment and memory dysfunction in rats. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 16: 79–89.

Lee C.W.T., Shuler M.L. (2000). The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 67(1): 61–71. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000105)67:1<61::AID-BIT7>3.0.CO;2-J.

Lieber C.S. (1997). Gastric Ethanol Metabolism and Gastritis: Interactions with Other Drugs, *Helicobacter pylori*, and Antibiotic Therapy (1957–1997) —a Review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(8):1360–1366. DOI: 10.1111/j.1530-0277.1997.tb04463.x.

Lin L., Wu J. (2002). Enhancement of shikonin production in single-and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound. *Biotechnology and bioengineering*, 78(1): 81–88. DOI: 10.1002/bit.10180.

Luna X. (1964). *Plantas Medicinales Mexicanas*. Secretaría de Educación Pública, Instituto Federal de Capacitación al Magisterio, México, p. 124.

Macovei A., Balestrazzi A., Confalonieri M., Carbonera D. (2010). The tyrosyl-DNA phosphodiesterase gene family in *Medicago truncatula* Gaertn.: bioinformatic investigation and expression profiles in response to copper-and PEG-mediated stress. *Planta*, 232(2): 393–407.

Mahattanadul S., Ridditid W., Nima S., Phdoongsombut N., Ratanasuwon P., Kasiwong S. (2011). Effects of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its biomarker scopoletin on reflux esophagitis and gastric ulcer in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 134(2): 243–250. DOI: 10.1016/j.jep.2010.12.004.

Maksymiec W. (1997). Effects of copper on cellular processes in higher plants. *Photothosynthetica*, 34(3): 321–342.

Maksymiec W. (2007). Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29:177–187. DOI: 10.1007/s11738-007-0036-3.

Maldonado J.M. (2013). Asimilación del nitrógeno y del azufre. En: Azcón-Bieto J., Talón M. (eds). *Fundamentos de Fisiología vegetal*, 2ª Ed. McGraw-Hill Interamericana de España, pp. 287–297.

Malik T.F., Gnanapandithan K., Singh K. (2020). Peptic Ulcer Disease. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [Updated 2020 Feb 15]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534792/>

Mandenius C.F. (2016). *Bioreactors: design, operation and novel applications*. John Wiley & Sons. pp. 421–431.

Manuele MG, Ferraro G, Arcos MLB, Lopez P, Cremaschi G, Anesini C (2006). Comparative immunomodulatory effect of scopoletin on tumoral and normal lymphocytes. *Life Sciences*, 79(21): 2043–2048. DOI:10.1016/j.lfs.2006.06.045.

Martínez S.M. (1987). Plantas autóctonas y productos volcánicos de las inmediaciones de Morelia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Biblioteca de Científicos Nicolaitas.

Martínez M., Matuda E. (1979). Flora del Estado de México. Tomo III. Ed. Biblioteca enciclopédica del Estado de México; México. p 495.

Matkowski A. (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants — A review. *Biotechnology Advances*, 26(6):548–560. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.

Matt P., Geiger M., Walch-Liu P., Engels C., Krapp A., Stitt M. (2001). Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. *Plant, Cell and Environment*, 24: 1119–1137. DOI: 10.1046/j.1365-3040.2001.00771.x.

Mithöfer A., Schulze B., Boland W. (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letter*, 566: 1–5. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.04.011.

Monroy-Ortiz C., Castillo-España P. (2007). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México pp. 251, 253, 319.

Montgomery D.C., Evans D.M. (1975). Second-order response surface designs in computer simulation. *Simulation*, 25(6):169–178. DOI:10.1177/003754977502500602.

Montgomery D.C., Loredó E.N, Jearkpaporn D., Testik M.C. (2002). Experimental Designs for Constrained Regions, *Quality Engineering*, 14(4):587–601. DOI: 10.1081/QEN-120003561.

Mora-Izquierdo A., Nicasio-Torres P., Sepúlveda-Jiménez G., Cruz-Sosa F. (2011). Changes in biomass allocation and phenolic compounds accumulation due to the effect of light and nitrate supply in *Cecropia peltata* plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6):2135–2147. DOI: 10.1007/s11738-011-0753-5.

Morimoto Y., Shimohara K., Oshima S., Sukamoto T. (1991) Effects of the new anti-ulcer agent KB5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *Japanese Journal of Pharmacology*, 57(4):495–505. DOI: 10.1254/jjp.57.495.

Mundo J., Villeda-Hernández J., Herrera-Ruiz M., del Carmen Gutiérrez M., Arellano-García J., León-Rivera I., Perea-Arango I. (2017). Neuropharmacological and neuroprotective activities of some metabolites produced by cell suspension culture of *Waltheria americana* Linn. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94:129–139. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.061.

Muñoz-Flores H.J., Orozco-Gutiérrez G., García-Magaña J., Coria-Ávalos V.M., Salgado-Garcicla R., Santiago-Santiago M.R. (2011). Épocas de colecta y tratamiento para enraizamiento de estacas de cirimo *Tilia mexicana* Schlecht. (Tiliaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(3):13-23.

Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiolgia Plantarum*, 15:473–497.

Namdeo A.G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 69-79.

Nicasio-Torres P, Meckes-Fischer M., Aguilar-Santamaría L., Garduño-Ramírez M.L., Chávez-Ávila V.M., Cruz-Sosa F (2012) Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(1):307–316. DOI: 10.1007/s11738-011-0830-9.

Nicasio-Torres P., Pérez-Hernández J., González-Cortázar M., Meckes-Fischer M., Tortoriello J., Cruz-Sosa F. (2016). Production of potential anti-inflammatory compounds in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(8):209. DOI: 10.1007/s11738-016-2211-x.

Noguerón-Merino M.C., Jiménez-Ferrer E., Román-Ramos R., Zamilpa A., Tortoriello J., Herrera-Ruiz M. (2015). Interactions of a standardized flavonoid fraction from *Tilia americana* with serotonergic drugs in elevated plus maze. *Journal of Ethnopharmacology*, 164:319–327. DOI: 10.1016/j.jep.2015.01.029).

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=762506&fecha=22/08/2001.

Oh T.Y., Lee J.S., Ahn B.O., Cho H., Kim W.B., Kim Y.B., Surh Y.J., Cho S.W., Lee K.M., Hahm K.B. (2001). Oxidative stress is more important than acid in the pathogenesis of reflux esophagitis in rats. *Gut*, 49:364–371. DOI: 10.1136/gut.49.3.364.

Oksman-Caldentey K.M., Inzé D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in plant science*, 9(9): 433–440. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.07.006.

Orozco-Sánchez F., Sepúlveda-Jiménez G., Trejo-Tapia G., Zamilpa A., Rodríguez-Monroy M. (2011). Oxygen limitations to grow *Azadirachta indica* cell culture in shake flasks. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10:343–352.

Palasota J.A., Deming S.N. (1992). Central composite experimental designs: Applied to chemical systems. *Journal of Chemical Education*, 69(7):560. DOI: 10.1021/ed069p560.

Pan R., Gao X.H., Li Y., Xia Y.F., Dai Y. (2010). Anti-arthritis effect of scopoletin, a coumarin compound occurring in *Erycibe obtusifolia* Benth stems, is associated with decreased angiogenesis in synovium. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24:477–490. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2009.00784.x.

Pan X.W., Shi Y.Y., Liu X., Gao X., Lu Y.T. (2004). Influence of inorganic microelements on the production of camptothecin with suspension cultures of *Camptotheca acuminata*. *Plant growth regulation*, 44(1): 59–63. DOI: 10.1007/s10725-004-1654-z.

Park J.M., Giles K.I., Songstad D.D. (1990). Industrial production of sanguinarine from the cell suspension culture of *Papaver somniferum*. *Process APBiotechnology*, Kyungju Publ., Korea, 184–187.

Pasqua, G., Avato P., Monacelli B., Santamaria A.R., Argentieri M.P. (2003). Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science*, 165(5): 977–982. DOI: 10.1016/s0168-9452(03)00275-9.

Pavón N.P., Rico-Gray V. (2000). An endangered and potentially economic tree of Mexico: *Tilia mexicana* (Tiliaceae). *Economic Botany*, 54:113–114.

Pavón-Reyes L., Evangelista-Lozano S., Sepúlveda-Jiménez G., Chávez-Ávila V., Rodríguez-Monroy M. (2016). Cell culture of *Bursera linanoe* in a stirred tank bioreactor for production of linalool and linalyl acetate. *Natural Product Communications*, 12(3):319–322.

Payá M, Goodwin PA, de las Heras B, Hoult JRS (1994). Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. *Biochemical Pharmacology*, 48: 445–451. DOI: 10.1016/0006-2952(94)90273-9.

Pereira P., Tysca D., Oliveira P., da Silva Brum L.F., Picada J.N., Ardenghi P. (2005). Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological research*, 52(3): 199-203.

Pérez-Hernández J., González-Cortázar M., Marquina S., Herrera-Ruiz M., Meckes-Fischer M., Tortoriello J., Cruz-Sosa F., Nicasio-Torres P. (2014). Sphaeralcic acid and tomentin, anti-inflammatory compounds produced in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia*. *Planta Medica*, 80(02/03):209–214. DOI: 10.1055/s-0033-1360302.

Pérez-Hernández J., Martínez-Trujillo A., Nicasio-Torres P. (2018). Optimization of active compounds production by interaction between nitrate and copper in *Sphaeralcea angustifolia* cell suspension using Response Surface Methodology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136(2): 407-413. DOI: 10.1007/s11240-018-1516-4.

Pérez-Hernández J., Nicasio-Torres M.D.P., Sarmiento-López L.G., Rodríguez-Monroy M. (2019). Production of anti-inflammatory compounds in *Sphaeralcea angustifolia* cell suspension cultivated in stirred tank bioreactor. *Engineering in Life Sciences*, 19(3): 196–205. DOI: 10.1007/s11240-018-1516-4.

Pérez-Ortega G., Guevara-Fefer P., Chávez M., Herrera J., Martínez A., Martínez A.L., González-Trujano M.E. (2008). Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacan, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3): 461–468. DOI: 10.1016/j.jep.2007.12.007.

Petersen M., Simmonds M.S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2): 121–125. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00513-7.

Phelps P. (1970). Polymorphonuclear leukocyte motility in vitro. IV. Colchicine inhibition of chemotactic activity formation after phagocytosis of urate crystals. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 13(1): 1–9. DOI: 10.1002/art.1780130101.

Piñol M.T., Palazón S., Cusidó R.M. (2013). Introducción al metabolismo secundario. En: Azcón-Bieto J., Talón M. (eds). *Fundamentos de Fisiología vegetal*, 2ª Ed. McGraw-Hill Interamericana de España, pp. 323, 324, 334, 335.

Praveen N., Murthy H.N., Chung I.M. (2011). Improvement of growth and gymnemic acid production by altering the macro elements concentration and nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. *Industrial Crops and Products*, 33(2): 282–286. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.12.015

Ramawat K.G., Mathur M. (2007). Factors affecting the production of secondary metabolites. En: Ramawat K.G., Merillon J.M. (eds.). *Biotechnology: secondary metabolites. Plants and microbes*, 2a Ed. Enfield, N.H., Science Publishers, U.S.A. pp. 59–102.

Rao S.R., Ravishankar G.A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2): 101–153. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.

Reyes-Chilpa R., Baggio C.H., Solano D.A., Muñoz E.E., Kauffman F.C., Sánchez R.I., Vela S.M. (2006). Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and

xanthenes isolated from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 167–172. DOI: g/10.1016/j.jep.2005.10.014.

Rocco A., Compare D., Angrisani D., Sanduzzi-Zamparelli M., Nardone G. (2014). Alcoholic disease: liver and beyond. *World Journal of Gastroenterology*, 20(40):14652-14659. DOI: 10.3748/wjg.v20.i40.14652.

Rout G.R., Samantaray S., Das P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18(2): 91–120.

Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177(1): 67–80. DOI: 10.1016/S0300-483X(02)00196-8.

Santiago-Gregorio D. (1998). Estudio de algunos factores que afectan el enraizamiento de esquejes de *Tilia mexicana* Schl. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.

Savegnago L., Trevisan M., Alves D., Rocha J.B.T., Nogueira C.W., Zeni G. (2006). Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21(1): 86–92. DOI: 10.1016/j.etap.2005.07.017.

Scheible W.R., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Schindelasch D., Thimm O., Udvardi M.K., Stitt M. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*, 136:2483–2499. DOI: 10.1104/pp.104.047019.

SEMARNAT-2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059: Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4254/semarnat/semarnat.htm>.

Siatka T., Chlebek J., Host'alkova A. (2017). Copper (II) sulphate stimulates scopoletin production in cell suspension cultures of *Angelica archangelica*. *Natural Product Communications*, 125(11):1779–1780.

Siatka T., Reichling J. (2000). Stimulation of scopoletin accumulation in *Archangelica officinalis* Hoffm. cell suspension cultures by fungal elicitors. *Herba Polonica*, 46(1):12–17.

Singh P., Vishwakarma S.P., Singh R.L. (2014). Antioxidant, oxidative DNA damage protective and antimicrobial activities of the plant *Trigonella foenum-graecum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12): 2497–2504. DOI: 10.1002/jsfa.6585.

Shay H., Komarov S.A., Fels S.S., Meranze D., Gruenstein M., Sipler, H. (1945). A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5:43–61.

Shay H., Sun D.C., Gruenstein M. (1954). A quantitative method for measuring spontaneous gastric secretion in the rat. *Gastroenterology*, 26(6), 906–913.

Smetanska I. (2008). Production of Secondary Metabolites: Using Plant Cell Cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 111: 187–228. DOI: 10.1007/10_2008_103.

Snowden F.M. (2008). Emerging and reemerging diseases: a historical perspective. *Immunological reviews*, 225(1): 9-26. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00677.x.

Soto J., Sousa M. (1995). *Plantas Medicinales de la Cuenca del Río Balsas*. En: Cuadernos 25. Instituto de Biología, UNAM, México, pp. 50–54, 169.

Stafford A.M. (2002). Plant cell cultures as a source of bioactive small molecules. *Current opinion in drug discovery and development*, 5(2): 296– 303.

Staniszewska I., Królicka A., Maliński E., Łojkowska E., Szafranek J. (2003). Elicitation of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Ammi majus* L. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5):565–568. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00180-7.

Tabata, M. Fujita, Y. (1985). Production of shikonin by plant cell cultures. En: Zeitlin M., Day P., Hollaender A. (eds). *Biotechnology in Plant Science*, Academic, New York, pp. 207–218.

Tadeo F.R., Gómez-Cadenas A. (2013). Fisiología de las plantas y el estrés. En: Azcón-Bieto J., Talón M. (eds). *Fundamentos de Fisiología vegetal*, 2ª Ed. McGraw-Hill Interamericana de España, pág. 594.

Takagi K., Okabe S. (1968). The effects of drugs on the production and recovery process of the stress ulcer. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 18: 9-11. DOI: 10.1254/jjp.18.9.

Tapia N., Zamilpa A., Bonfil M., Ventura E., Cruz-Vega D., del Villar A., Cruz-Sosa F., Osuna L. (2013). Effect of the culture medium and biotic stimulation on taxane production in *Taxus globosa* Schltdl. *in vitro* cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35:3447–3455. DOI: 10.1007/s11738-013-1380-0.

Trejo-Espino J.L., Rodríguez-Monroy M., Vernon-Carter E.J., Cruz-Sosa F. (2011). Establishment and characterization of *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) MC Johnst. cell suspension culture: a biotechnology approach for mesquite gum production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5):1687–1695. DOI: 10.1007/s1173 8-010-0705-5.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl.) Hardin [Internet] Saint Louis, Missouri, U.S. [cited 2016 Feb 03]. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/50216006>.

Van Ryswyk H., Van Hecke G.R. (1991). Attaining optimal conditions: An advanced undergraduate experiment that introduces experimental design and optimization. *Journal of Chemical Education*, 68(10): 878. DOI: 10.1021/ed068p878.

Vidari G., Finzi P.V., Zarzuelo A., Gálvez J., Zafra C., Chiriboga X., Berenguer B., La Casa C., Alarcón de la Lastra C., Motilva V., Martín M.J. (2003). Antiulcer and

antidiarrhoeic effect of *Baccharis teindalensis*. *Pharmaceutical biology*, 41(6):405-411. DOI: 10.1076/phbi.41.6.405.17832.

Viola H., Wolfman C., Levi de Stein M., Wasowski C., Peña C., Medina J.H., Paladín A.C. (1994). Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 44:47–53. DOI: 10.1016/0378-8741(94)90098-1.

Wang R., Tischner R., Gutierrez R.A., Hoffman M., Xing X., Chen M., Coruzzi G., Crawford N.M. (2004). Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136: 2512–2522. DOI: 10.1104/pp.104.044610.

Wilson S.A., Roberts S.C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnology Journal*, 10(3): 249–268. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2011.00664.x.

Wu J., Zhong J.J. (1999). Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects. *Journal of Biotechnology*, 68(2-3): 89–99. DOI: 10.1016/S0168-1656(98)00195-3.

Xing J., Zhao D., Li, M., Ye H., Li G., Li Z. (1999). Effect of carbon and nitrogen sources on cell growth and flavonoids production in suspension cultures of *Saussurea medusa*. *Chinese journal of biotechnology*, 15(2): 230–234.

Yang L., Wen K.S., Ruan X., Zhao Y.X., Wei F., Wang Q. (2018) Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4):762. DOI: 10.3390/molecules23040762.

Yoshikawa T., Minamiyama Y., Ichikawa H., Takahashi S., Naito Y., Kondo M. (1997). Role of lipid peroxidation and antioxidants in gastric mucosal injury induced by the hypoxanthine-xanthine oxidase system in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 23: 243–250. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00625-9.

Yu F., Zhang D., Bai F., An L. (2005). Effect of salicylic acid on secondary metabolism in cell suspension culture of *Camptotheca acuminata*. *Gaojishu tongxun*, 15(1): 70–73.

Yuan Y., Padol I.T., Hunt R.H. (2006). Peptic ulcer disease today. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 3(2): 80–89. DOI: 10.1038/ncpgasthep0393.

Yuan Y.J., Wei Z.J., Wu Z.L., Wu J.C. (2001). Improved Taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* by *in situ* extraction combined with precursor feeding and additional carbon source introduction in an airlift loop reactor. *Biotechnology letters*, 23(20): 1659–1662. DOI: 10.1023/A:1012483329863.

Zhang W., Bai X., Bu Z., Wang J., Yu X., Yuan Q. (1998). Enhanced production of harringtonine and homoharringtonine in *Cephalotaxus fortunei* callus culture by periodic temperature oscillation. *Biotechnology letters*, 20(1): 63–66. DOI: 10.1023/A:1005387331909.

Zheng Z., Zhou Y., Liu D., Hu Z. (2002). Cell growth and ajmalicine accumulation in a full habituated *Catharanthus roseus* cell line C₂₀ hi. *Acta Botanica Sinica*, 44(10): 1146–1150.

Zhong J.J., Yue C.J. (2005). Plant cells: secondary metabolite heterogeneity and its manipulation. En: Nielsen J. (eds). *Biotechnology for the Future. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 100, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 53–88. DOI: 10.1007/b136412.

Zhou L.G., Wu J.Y. (2006). Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natural Product Reports*, 23(5): 789–810. DOI: 10.1039/B610767B.

Zhou X., Zhong J.J. (2009). Effect of initial ammonium concentration on taxoid production and biosynthesis genes expression profile in suspension cultures of *Taxus chinensis* cells. *Engineering in Life Sciences*, 9(3):261–266. DOI: 10.1002/elsc.200800109.

Zurita-Valencia W., Gómez-Cruz J.E., Atrián-Mendoza E., Hernández- García A., Granados García M.E., García-Magaña J.J., Salgado-Garciglia R., Sánchez-Vargas N.M. (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae). *Polibotánica*, 38: 129–144.

XII. ANEXOS

Artículo de investigación:

Enhancing the production of scopoletin and quercetin
3-O- β -D-glucoside from cell suspension cultures of *Tilia americana* var.
mexicana by modulating the copper and nitrate concentrations.

Autores: Daniel Cisneros-Torres, Francisco Cruz-Sosa, Manasés González-Cortazar,
Aurora Martínez-Trujillo, Pilar Nicasio-Torres

Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) (2019) 139:305–316
<https://doi.org/10.1007/s11240-019-01683-7>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00225

Matrícula: 2161801736

Producción de compuestos activos en suspensiones celulares de *Tilia americana* var. mexicana, por estimulación abiótica empleando el modelo de superficie de respuesta.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 8 del mes de junio del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DRA. MARIA AURORA MARTINEZ TRUJILLO
DRA. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO
DR. MANASÉS GONZÁLEZ CORTAZAR



Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: DANIEL CISNEROS TORRES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DANIEL CISNEROS TORRES
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DRA. MARIA AURORA MARTINEZ TRUJILLO

VOCAL

DRA. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO

SECRETARIO

DR. MANASÉS GONZÁLEZ CORTAZAR