

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Actividad anti-inflamatoria y anti-ulcerogénica de hojas de planta silvestre y tejidos desdiferenciados de *Tilia americana* variedad *mexicana* (Schltd) Hardin.

TESIS

Que presenta:

M. C. Karen Jhoana Flores Sánchez

Matrícula: 2153804287

Para obtener el grado de Doctora en Biotecnología

Director:

Dr. Francisco Cruz Sosa.

Codirectora:

Dra. María del Pilar Nicasio Torres.

JURADO:

Presidenta: Dra. Angélica Román Guerrero.

Secretario: Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez.

Vocal: Dra. Sandra Luz Cabrera Hilerio.

Vocal: Dr. Antonio Romero Estrada.

Iztapalapa, Ciudad de México, octubre 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, con número de (CVU/becario): 308879/593703.

Ciudad de México D.F. a 27 de Octubre del 2020.

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

Actividad anti-inflamatoria y anti-ulcerogénica de hojas de planta silvestre y tejidos
desdiferenciados de *Tilia americana* variedad *mexicana* (Schltd) Hardin.

Que presentó

M. C. Karen Jhoana Flores Sánchez.

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa. Universidad Autónoma Metropolitana.

Codirectora: Dra. María del Pilar Nicasio Torres. CIBIS-IMSS.

Asesor: Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez. CIBIS-IMSS.

Jurado:

Presidenta: Dra. Angélica Román Guerrero



Secretario: Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez



Vocal: Dra. Sandra Luz Cabrera Hilerio



Vocal: Dr. Antonio Romero Estrada.



DEDICATORIAS

- A mis padres Juanita y Nachito, por estar siempre conmigo y apoyarme en todos los momentos de mi vida.
- A mis hermanos Jhonatan y Jazy, aunque a veces discutimos por desacuerdos, seguimos juntos y apoyándonos como la familia que somos.
- A mi cuñada Lupita, eres como la hermana que nunca tuve, espero seguir contando con tu apoyo y consejos siempre.
- Pero sobre todo a ti, Johann Tadeo, eres mi más grande anhelo, en compañía de Dios que mis pasos sean tu guía y llegues más alto en lo profesional y/o personal que tú mamá, te amo.

Gracias Dios:

Porque aunque no poseo mucho dinero, ni tengo muchos lujos, tengo vida, salud y una hermosa familia:

“La familia es la brújula que nos guía. Son la inspiración para llegar a grandes alturas y nuestro consuelo cuando ocasionalmente fallamos.”

Brad Henry.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por darme la salud, sabiduría y fuerza para alcanzar mis metas, por ser mi guía en los caminos inciertos e inseguros.
- A la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa por aceptarme como estudiante del posgrado en biotecnología y dejar que alcanzará una meta profesional más.
- CONACYT por la beca otorgada para mis estudios de doctorado.
- Al IMSS por la beca otorgada para mis estudios de doctorado.
- Dr. Francisco Cruz por darme la oportunidad de aceptarme como tesista, por sus consejos y apoyo brindado para la culminación de mis estudios de doctorado.
- Dra. Pily por enseñarme otra parte de lo hermoso que es la biotecnología vegetal, pero sobre todo a ser mi amiga y consejera en los momentos en que sentí derrotada, muchas gracias.
- A mi asesor Dr. Alejandro Zamilpa por asesorarme y compartir conmigo sus conocimientos en el área de fitoquímica.
- A los integrantes del comité revisor, por las observaciones y aportaciones realizadas para que este trabajo de investigación tenga una mejor interpretación.
- A la Dra. Maribel Herrera del CIBIS-IMSS, por enseñarme la técnica y darme los consejos para la realización del modelo de úlcera gástrica inducida con etanol en un modelo murino.
- A la familia Figueroa Barrera, especialmente a Saúl, por apoyarme en las colectas del material vegetal realizadas en el poblado de Mexicapan, Ciudad de México, para así realizar los objetivos planteados en este trabajo de investigación, ya que sin tú ayuda esto hubiera sido más difícil.
- A mis amigos (Carlos, Hugo, Daniel, Rogelio, Javier, Manuel, David, Flor y Lolita) del laboratorio de biotecnología del CIBIS-IMSS, por los bellos momentos que compartimos juntos para que esta estancia fuera más placentera, pero sobre todo por sus buenos y malos consejos, jijiji.
- Al Departamento de Ing. Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Zacatepec, especialmente a mi jefe M. C. Manuel

- Granados por el apoyo brindado para crecer en mi carrera profesional, por ser mi amigo y consejero.
- A todos los integrantes del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS), por su amistad verdadera y consejos para la realización de este trabajo de investigación.
 - A los estudiantes de la carrera de Ing. Bioquímica, generaciones 2016-2018, por su comprensión y su esfuerzo para salir adelante ante la ausencia de su profesora al no atender del todo y a tiempo sus necesidades.
 - A todos aquellas personas que no aparecen en este documento, pero que sin duda marcaron una enseñanza en mi formación profesional y carácter.

Para todos, no queda más que decir:

¡MUCHAS GRACIAS!

“Siempre hay que encontrar el tiempo para agradecer a las personas que hacen una diferencia en nuestra vida.”

Anónimo.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
var	Variedad
T	Tilia
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
CN	Cinetina
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido Naftalenacético
BA	6-Bencilaminopurina.
TDZ	Tidiazurón.
BAP	6-benzilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)-9H-purina
AIA	Ácido Indolacético
AIP	Ácido Indolpropiónico
ADP	Adenosín Difosfato
PQM	Proteína Quimiotáctica de Macrófagos
PAF	Factor Activador de Plaquetas
AA	Ácido Araquidónico
PG	Prostaglandinas
LT	Leucotrienos
Lx	Lipoxinas
HETE	Ácido hidroxieicosatetranoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
DHA	Ácido docosahexaenoico
PA2	Forfolipasa
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
5-HT	Serotonina
BK	Bradicinina
PKC	Proteína quinasa C
PPO	Polifenol oxidasa
2ip	2-Indolaminopurina

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Resumen	xv
Abstract	xvii
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Plantas medicinales: biodiversidad e importancia	1
1.1.1 Recolección y usos de las plantas medicinales	2
1.1.2 Producción y comercialización de plantas aromáticas y medicinales	5
1.1.3 Contexto actual de las plantas medicinales	6
1.2 Especie en estudio: <i>Tilia americana</i> variedad <i>mexicana</i>	8
1.2.1 Descripción botánica	8
1.2.2 Usos medicinales	9
1.2.3 Estudios farmacológicos y químicos	9
1.2.4 Situación ecológica	11
1.2.5 Estudios biotecnológicos	11
1.3 Métodos de propagación sexual y asexual	13
1.3.1 Métodos convencionales de multiplicación vegetativa asexual	15
1.3.2 Cultivo de tejidos vegetales	16
1.3.3 Reguladores del crecimiento vegetal	21
1.4 Inflamación	23
1.4.1 Mediadores de la respuesta inflamatoria	24
1.4.2 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos	28
1.4.3 Modelos farmacológicos de evaluación antiinflamatoria	30
1.5 Úlceras gástricas	32
1.5.1 Mecanismos de control de la secreción gástrica	33
1.5.2 Barrera mucosa gástrica	35
1.6 Úlcera péptica	36
1.6.1 Úlceras gástricas	38
1.6.1.1 Fármacos usados en la terapéutica de problemas gástricos	40
1.6.1.2 Modelos farmacológicos de evaluación gastroprotectora	42
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46

	Páginas
3. JUSTIFICACIÓN	48
4. OBJETIVOS	49
4.1 Objetivo general	49
4.2 Objetivo específico	49
5. HIPÓTESIS	50
6. MATERIALES Y MÉTODOS	51
6.1 Colecta del material vegetal	51
6.2 Propagación vegetativa	51
6.3 Cultivos <i>in vitro</i>	52
6.3.1 Medio de cultivo	52
6.3.2 Cultivo aséptico	53
6.3.3 Inducción de brotes y callos	53
6.3.4 Instalación de los sistemas de inmersión temporal tipo RITA®	54
6.3.5 Inducción de brotes mediante el sistema RITA®	55
6.4 Análisis químico	55
6.4.1 Obtención de extractos	55
6.4.2 Análisis de escopoletina, 3-β-D-glucósido de quercetina y tilirósido	56
6.4.3 Condiciones de HPLC	56
6.4.4 Fraccionamiento del extracto metanólico de biomasa de callo	57
6.4.5 Análisis de HPLC del fraccionamiento del extracto metanólico de biomasa de callo	58
6.5 Evaluación biológica	59
6.5.1 Animales	59
6.5.2 Edema auricular inducido con TPA	59
6.6 Úlceras gástricas inducidas con etanol	60
6.6.1 Determinación del área ulcerada	61
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	63
7.1 Obtención de plantas de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> a partir de esquejes	63
7.2 Desinfección de explantes de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i>	65
7.3 Inducción de brotes y callos	67
7.4 Sistemas de inmersión temporal (RITA®)	75
7.5 Extracción y aislamiento de compuestos activos	79

	Páginas
7.6 Edema Auricular inducido con TPA	87
7.7 Úlcera gástrica inducida con etanol	92
8. CONCLUSIONES	97
9. PERSPECTIVAS	99
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
11. PUBLICACIÓN	108
12. ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA	118

ÍNDICE DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1.	Venta de plantas medicinales en mercados municipales. Tomada de https://www.alamy.es	3
Figura 2.	Fotografía de <i>Tilia americana</i> variedad <i>mexicana</i> y sus diversos órganos: a) tallo, b) flor, c) brácteas y frutos, d) hojas. Tomada de https://www.google.com.mx/search?q=tilia+americana+var.+mexicana .	9
Figura 3.	Principales tipos de propagación vegetativa asexual: a) Acodo, b) Injerto y c) Esqueje. Tomado de https://www.google.com.mx/search?q=acodo-injeto-esqueje .	16
Figura 4.	Principales métodos de micropropagación. Tomado de: https://www.google.com.mx/search?q=Principales+metodos+de+micropropagación .	18
Figura 5.	Principales etapas de la micropropagación. Tomada de: https://www.google.com.mx/search?q=Principales+etapas+de+la+micropropagación+in+vitro .	19
Figura 6.	Estómago: a) Partes, b) Capas y c) Glándula gástrica. Tomada de: https://www.google.com.mx/search?q=Estomago+y+sus+partes+glandula+gástrica .	33
Figura 7.	Mecanismo de secreción de ácido HCl: a) Fase cefálica, b) fase gástrica y c) fase intestinal. Tomada de: https://www.google.com.mx/search?q=mecanismo+de+secreción+de+HCl .	35
Figura 8.	Tipos de úlcera péptica: a) gástrica y b) duodenal. Tomada de: https://www.google.com.mx/search?q=tipos+de+úlcera+péptica .	38
Figura 9.	Capas del estómago afectadas por una úlcera péptica: a) normal, b) erosión y c) úlcera. Tomada de: https://www.google.com.mx/search?q=capas+del+estómago+afectadas+por+una+úlcera+péptica	39
Figura 10.	Fármacos antiseoretos H2: a) estructura química y b) mecanismo de acción. Tomado de: https://www.google.com.mx/search?q=estructura+química+de+los+diferentes+antiseoretos .	41

		Páginas
Figura 11.	Brotos y plantas generados a partir de esquejes de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> : a) yemas apicales 8 días de cultivo, b) yemas axilares 25 días de cultivo, c) plantas en condición de invernadero y d) planta en condiciones medioambientales.	64
Figura 12.	Desinfección con extrán y NaOCl de explantes de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> : a) yema axilar, b) apical y c) oxidación a 30 días de cultivo y c) contaminación a 7 días de cultivo.	66
Figura 13.	Brotos de explantes de yemas apicales (arriba) y axilares (abajo) de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> cultivadas en medio MS suplementado con BA: (a y d) 0.5 mg/L, (b y e) 1.0 mg/L y (c y f) 2.0 mg/L en combinación con 0.25 mg/L de ANA a los 90 días de cultivo.	69
Figura 14.	Brotos de explantes de yemas apicales (arriba) y axilares (abajo) de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> cultivadas en medio MS suplementado con TDZ: (a y d) 0.005 mg/L, (b y e) 0.01 mg/L y (c y f) 0.02 mg/L en combinación con 0.1 mg/L de AIB a los 90 días de cultivo.	71
Figura 15.	Callogénesis de explantes de yemas apicales (arriba) y axilares (abajo) de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> cultivadas en medio MS suplementado con TDZ: (a y d) 0.005 mg/L, (b y e) 0.01 mg/L y (c y f) 0.02 mg/L en combinación con 0.1 mg/L de AIB a los 90 días de cultivo.	73
Figura 16.	Callogénesis de explantes de yemas apicales (arriba) y axilares (abajo) de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> cultivadas en medio MS suplementado con BA: (a y d) 0.5 mg/L, (b y e) 1.0 mg/L y (c y f) 2.0 mg/L en combinación con 0.25 mg/L de ANA a los 90 días de cultivo.	74
Figura 17.	Sistemas de inmersión temporal tipo RITA [®] de explantes de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> : a) yemas axilares (arriba) y apicales (abajo) a 1 día de cultivo, b) yemas axilares (arriba) y apicales (abajo) a una frecuencia/tiempo de inmersión 8 h/3 min y c) yemas axilares a una frecuencia/tiempo de inmersión 8 h/1 min a los 90 días de cultivo.	76
Figura 18.	Cromatogramas de HPLC de los compuestos 3-β-D-Glucósido de quercetina (9.22 min), escopoletina (11.155 min) y tilirósido (17.481 min) detectados en los extractos metanólicos de: a) hojas del árbol silvestre, b) callo obtenido de hojas y c) Callo obtenido de yemas apicales de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> a $\lambda = 355$ nm.	80

		Páginas
Figura 19.	Cromatogramas de HPLC y espectros de absorción de los estándares: a) 3-β-D-glucósido de quercetina, b) Escopoletina y c) Tilirósido a $\lambda = 355$ nm.	81
Figura 20.	Perfil cromatográfico del extracto metanólico de biomasa de callo de yemas apicales de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> : a) F6, b) F15 y c) F23 en cromatoplasmas de sílica gel, sistema de elusión CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (8:2, a) y (9:1, b y c), revelador 2-aminoacetil difenilborinato, luz visible $\lambda = 365$ nm.	85
Figura 21.	Cromatograma de HPLC (a) y espectros de absorción (b) de los constituyentes mayoritarios de la fracción F15 del extracto metanólico de biomasa de callo de yemas apicales de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> .	86
Figura 22.	Relación entre la dosis de los extractos metanólicos de las hojas (a) y callos (b) de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> y el porcentaje de inhibición del edema auricular; y entre las dosis y el peso del edema auricular inducido con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol. La línea de ajuste fue generada por regresión lineal (n = 5). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.	89
Figura 23.	Estómagos de ratones con úlcera gástrica inducida con etanol: a) Tween 20 al 1%, b) Famotidina a 20 mg/kg, extractos metanólicos a 100 mg/kg de: c) hojas de la planta, d) biomasa de callo, fracciones a 10 mg/kg: e) F6, f) F15 y g) F23 de <i>T. americana</i> var. <i>mexicana</i> .	93

ÍNDICE DE TABLAS

		Páginas
Tabla 1.	Tipos y efectos de reguladores del crecimiento vegetal utilizados en la micropropagación.	21
Tabla 2.	Clasificación de los principales AINEs.	29
Tabla 3.	Propiedades farmacocinéticas de los fármacos antisecretores H ₂ .	40
Tabla 4.	Modelos animales de erosiones, úlceras gástricas y duodenal.	43
Tabla 5.	Condiciones del sistema de elución del fraccionamiento del extracto metanólico de biomasa de callo de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> .	58
Tabla 6.	Efecto de las concentraciones de 6-Bencil aminopurina (BA) y tidiazurón (TDZ) en el desarrollo de brotes y callos en yemas apicales y axilares de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> .	70
Tabla 7.	Contenido de compuestos activos en los extractos metanólicos de hojas y callos de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> .	82
Tabla 8.	Fracciones obtenidas del extracto metanólico de biomasa de callo de yemas apicales de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> .	85
Tabla 9.	Efecto de los extractos metanólicos de hojas, callos y fracciones de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> en el modelo de edema auricular inducido con TPA.	88
Tabla 10.	Efecto gastoprotector de los extractos metanólicos de hojas, callos y fracciones de <i>Tilia americana</i> var. <i>mexicana</i> en el modelo de úlcera gástrica inducida con etanol.	94

RESUMEN

En la medicina tradicional mexicana se utilizan las brácteas de *Tilia americana* variedad *mexicana* (Schltd) Hardin, conocida en México como tila, principalmente para el tratamiento de trastornos nerviosos. Investigaciones recientes han permitido corroborar sus efectos antidepresivos, ansiolíticos, analgésicos y sedantes, los cuales son atribuidos a los compuestos tilirósido, quercetina, rutina, canferol, isoquercitrina, luteolina y apigenina; también se han identificado taninos, cumarinas, ácidos fenólicos y polifenoles. Infusiones de las hojas e inflorescencias del árbol también son utilizadas tradicionalmente, en el tratamiento de afecciones que conllevan a un proceso inflamatorio y enfermedades gastrointestinales; estos efectos farmacológicos no han sido explorados científicamente. Considerando que la SEMARNAT ha catalogado esta especie como en peligro de extinción con base a la NOM-059-SEMARNAT-2010, debido a la sobreexplotación de su madera, flores y hojas, ha sido importante buscar estrategias biotecnológicas que permitan el rescate de *T. americana* var. *mexicana*. Para contar con material vegetal de calidad para continuar con estudios biotecnológicos, fitoquímicos y farmacológicos conducentes a la elaboración de un fitofármaco, se ha abordado el enraizamiento de estacas y micropropagación empleando explantes de yemas axilares empleando el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) complementado con 0.25 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) en combinación con 1.0 mg/L de bencilaminopurina (BA) se obtuvo 7.75 brotes/explante a los 60 días de cultivo. Los brotes regenerados fueron enraizados con 5.0 mg/L de ácido indol-3-butírico (AIB) y posteriormente se aclimataron.

En este trabajo de investigación, se obtuvieron plantas a partir de esquejes enraizados con AIB en condiciones de invernadero, las cuales se aclimataron en maceta a las condiciones ambientales en Xochitepec, Morelos. Así mismo, se establecieron cultivos *in vitro* de brotes múltiples y callos a partir de explantes de yemas apicales y axilares de *T. americana* var. *mexicana*. Las yemas apicales (75%) generaron principalmente brotes (2-3 brotes/explante) en el medio de cultivo MS suplementado con 2.0 mg/L de BA en combinación con 0.25 mg/L de ANA. La callogénesis se presentó en ambos tipos de yemas en los tratamientos (0.005-0.02 mg/L) constituidos por tidiazurón (N-fenil-N'-1,2,3-thidiazol-5-ilurea, TDZ) en combinación con 0.1 mg/L de AIB.

En el análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de los extractos metanólicos de hojas de la planta silvestre y de biomasa de callo de yemas apicales,

se detectó la presencia de los compuestos con actividad ansiolítica 3-β-D-glucósido de quercetina y tilirósido ya reportados; además de escopoletina, compuesto conocido por sus propiedades antiinflamatorias.

Con base al uso tradicional de los tejidos aéreos del árbol de tilia para tratar problemas gastrointestinales y la presencia de escopoletina en las hojas de la planta silvestre y de biomasa de callo, los extractos metanólicos de ambos tejidos se evaluaron en modelos murinos de inflamación y úlceras. Ambos extractos mostraron actividad antiinflamatoria de forma dosis-dependiente en el modelo de edema auricular inducido con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), con una dosis efectiva media (DE₅₀) de 0.38 y 1.73 mg/oreja para los extractos de hojas y callo, respectivamente. Asimismo, en el modelo de úlceras gástricas inducidas con etanol, los extractos metanólicos de hojas de la planta silvestre y de biomasa de callo presentaron un efecto gastroprotector de 35 y 29%, respectivamente.

Con base a estos resultados, el extracto metanólico de biomasa de callo se fraccionó en columna abierta utilizando un sistema de elución diclorometano:metanol. Con base a su perfil químico observado en cromatografía en capa fina, las fracciones F6, F15 y F23 integradas por compuestos de baja, mediana y alta polaridad, se evaluaron en los modelos biológicos antes mencionados. La fracción F15, constituida por escopoletina y esculina entre otras cumarinas, fue la más activa ($p < 0.05$) en ambos modelos murinos, con una inhibición del 27% del edema auricular y con un efecto gastroprotector del 55%. Escopoletina y esculina se han aislado de varias especies de plantas, y en estudios científicos se han reportado sus propiedades antiinflamatorias; así como un efecto gastroprotector para escopoletina. Debido a estos hallazgos, es importante establecer el cultivo de células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana* en el medio de cultivo MS y caracterizar el crecimiento y producción de compuestos activos, así como evaluar sus estrategias de estimulación.

Palabras clave: antiinflamatorio, callos, escopoletina, gastroprotector, micropropagación, tilirósido.

ABSTRACT

In Mexican traditional medicine, the inflorescences of *Tilia americana* variedad *mexicana* (Schltd) Hardin, known in Mexico as tila, are mainly used for the treatment of nervous disorders. Recent research has allowed us to corroborate its antidepressant, anxiolytic, analgesic and sedative effects, which are attributed to the compounds tiliroside, quercetin, rutin, kaempferol, isoquercitrin, luteolin and apigenin; tannins, coumarins, phenolic acids and polyphenols have also been identified. Infusions from leaves and inflorescences are also traditionally used in the treatment of conditions that lead to an inflammatory process and gastrointestinal disorders; these pharmacological effects have not been scientifically explored. Considering that SEMARNAT has cataloged this species as endangered based on NOM-059-SEMARNAT-2010, due to the overexploitation of its woods, flowers and leaves, it has been important to look for biotechnological strategies that allow the rescue of *T. americana* var. *mexicana*. In order to ensure the continuous quality in plant material for carrying biotechnological, phytochemical and pharmacological studies leading to the development of a phytopharmaceutical product, the use of cutting rooting and micropropagation by seedling bud explants, in culture medium of Murashige and Skoog (MS) supplemented with 0.25 mg/L of naphthalenacetic acid (NAA) in combination with 1.0 mg/L of 6-benzyl aminopurine (BA), 7.75 shoots/explant were obtained at 60 days of culture. The regenerated shoots were rooted with 5.0 mg/L of indole-3-butyric acid (IBA) and subsequently acclimatized. In this research work, plants were obtained from cuttings rooted with IBA under greenhouse conditions, which were acclimatized in pot to the environmental conditions in Xochitepec, Morelos. Thus, *in vitro* cultures of multiple shoots and callus were established from explants of apical and axillary buds of *T. americana* var. *mexicana*. The apical buds (75%) generated mainly shoot (2-3 shoots per explant) in culture medium MS, supplemented with 2.0 mg/L of BA in combination with 0.25 mg/L NAA. Callogenesis occurred in both types of buds in treatments (0.005-0.02 mg/L) consisting of thidiazuron (TDZ) in combination with 0.1 mg/L of IBA.

In the analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) for methanolic extracts of wild plant leaves and callus biomass from apical buds, the presence of compounds associated to anxiolytic activity like quercetin 3- β -D-glucoside and tiliroside, was detected; besides, scopoletin a compound known for its anti-inflammatory properties.

Based on the traditional use of the aerial tissues of the tilia tree to treat gastrointestinal problems and the presence of scopoletin in the leaves of the wild plant and callus biomass, the methanolic extracts of both tissues were evaluated in murine models of inflammation and ulcers. Both extracts showed a dose-dependent anti-inflammatory activity in the model of ear edema induced with 12-O-tetradecanoylforbol-13-acetate (TPA), with an average effective dose (ED₅₀) of 0.38 and 1.73 mg/ear for leaf and callus extracts, respectively. Likewise, in the model of gastric ulcers induced with ethanol, the methanolic extracts of leaves from the wild plant and callus biomass had a gastroprotective effect of 35% and 29%, respectively. Based on the results, methanolic extract from the callus biomass was fractionated in an open column using a dichloromethane:methanol elution systems. Considering their chemical profile in thin layer chromatography, fractions F6, F15 and F23 composed of low, medium, and high polarity compounds, were evaluated in the biological models mentioned before. The F15 fraction, consisting of scopoletin and esculin among other coumarins, was the most active ($p < 0.005$) in both murine models, with a 27% inhibition for ear's edema and a 55% gastroprotective effect. Scopoletin and sculin have been isolated from several species of plants, and their anti-inflammatory properties have been reported in scientific studies; as well as a gastroprotective effect for scopoletin. Due to these findings, it is important to establish the suspension cell culture of *Tilia americana* var. *mexicana* in MS culture medium and characterize the growth and production of active compounds, as well as evaluate their stimulation strategies.

Keywords: anti-inflammatory, callus, scopoletin, gastroprotective, micropropagation, tiliroside.

1. ANTECEDENTES

1.1 Plantas medicinales: biodiversidad e importancia

La biodiversidad se describe como la variedad de vida en la Tierra y es fundamental porque proporciona servicios ambientales básicos para los seres humanos. Este término implica también que ningún organismo puede vivir en aislamiento, puesto que las formas en que los millones de organismos interactúan en la Tierra contribuyen al equilibrio del ecosistema (Luna, Castañón y Raz, 2011).

De acuerdo con la CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad), México ocupa el quinto lugar a nivel mundial en número de plantas vasculares (www.noticias.universia.net.mx, 2014). La biodiversidad de México se debe principalmente a su ubicación geográfica, la variedad de climas, temperaturas frías hasta cálidas y a su topografía desde zonas planas hasta muy intrincadas que presenta a lo largo de todo el territorio mexicano (www.mexicodesconocido.com.mx, 2010). Estas características han permitido el desarrollo de alrededor de 7,000 especies vegetales, de las cuales unas 4,000 especies son utilizadas como plantas medicinales, y han formado parte de nuestra historia utilizándose desde tiempos prehispánicos por los diferentes grupos étnicos (Mendoza y Loraine, 2010). Este patrimonio cultural se ha transmitido de generación en generación, de manera que algunas costumbres subsisten de manera cotidiana, tanto en áreas rurales como urbanas (García *et al.*, 2011; Ocegueda *et al.*, 2005). La Organización Mundial de Salud (OMS) estima que el 80% de las personas en regiones rurales emplean la medicina tradicional con plantas para el cuidado de la salud, lo que está basado en la eficiencia, es decir, acepta y adopta lo que se ve que sirve (Mendoza y Loreaire, 2010; www.who.int, 2004).

La OMS define a las plantas medicinales como toda especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Así mismo, son las principales fuentes de obtención de ciertos compuestos (Juárez *et al.*, 2013):

- ❖ *Industria farmacéutica.* Principalmente en Alemania y Francia se utilizan las plantas secas, extractos o sus principios activos para la fabricación de fitofármacos.
- ❖ *Aromaterapia.* Utiliza aceites esenciales.
- ❖ *Herbolaria.* Abarca un amplio campo de conocimientos y prácticas en las que las personas recurren a las plantas para tratar diversos padecimientos de salud.
- ❖ *Sector alimentario.* Utiliza con mayores frecuencias condimentos de origen natural como saborizantes, colorantes y conservadores debido a su actividad antioxidante, antibacterial y antifúngica.

Para la conservación de las propiedades medicinales de las plantas se necesitan respetar algunas reglas como son: la recolección, desecación, almacenamiento y por último la presentación como pueden ser infusiones, extractos o cápsulas, entre otras más, que permitan la calidad e inocuidad de sus propiedades medicinales (Ocegueda *et al.*, 2005).

1.1.1 Recolección y usos de las plantas medicinales

Un mercado puede definirse como un espacio establecido en un sitio de las ciudades, colonias, municipios, poblados y rancherías a donde acuden sus pobladores a la compra-venta de satisfactores y así mismo, brindan servicios. Entre los mexicas, tenemos, el *tianguis* del náhuatl, *tianguiztli*, era el espacio donde se reunían un día a la semana los productores para vender, comprar e intercambiar sus diversos productos como: frutos, plumas, pieles de animales, cerámicas e instrumentos líticos de lujo y ceremoniales, piezas de joyería y por supuesto hierbas medicinales.

Los conquistadores españoles se admiraron de los mercados mexicas, como lo mencionó Hernán Cortés cuando escribió su segunda carta dirigida a Carlos V el 30 de Octubre de 1520, detallando una larga lista de los productos ahí ofrecidos, animales, minerales y vegetales, relatando:

“Hay calle de herbarios, donde hay todas las raíces y hierbas medicinales que en la tierra se hallan. Hay casas como de boticarios donde se venden las medicinas hechas, así potables como unguentos y emplastos”.

Actualmente se designa la palabra “mercado” al lugar permanente, con edificaciones casi siempre estables donde se adquieren los satisfactores para la vida cotidiana familiar (Figura 1), mientras que el vocablo “tianguis” se refiere a aquellas vendimias semanales que se realizan rotativamente en un día predeterminado en poblaciones, barrios o colonias. En general, estos lugares han sufrido las agresiones de la modernidad y los cambios culturales han hecho que pierdan sus esencias originales (Belluci, 2002).

En los mercados mexicanos se puede encontrar una amplia diversidad de plantas medicinales procedentes de varias partes del país. Esta actividad fortalece las relaciones entre la gente debido a que los mercaderes ofrecen una fuente de información de especies útiles (Figura 1). Los estudios etnobotánicos realizados en los mercados han permitido conocer la distribución y venta de las plantas cultivadas y silvestres de México, sean exóticas o nativas y los usos que se les da a estos recursos vegetales. El uso de las plantas medicinales en México está ampliamente difundido y muchas de ellas son objeto de un activo comercio a nivel nacional e internacional (Martínez *et al.*, 2006; Manzanero *et al.*, 2009).



Figura 1. Venta de plantas medicinales en mercados municipales. Tomada de <https://www.alamy.es>

En la Ciudad de México se encuentra el mercado de Sonora que forma parte del complejo “Mercado de la Merced”, donde se encuentran y venden una amplia variedad de plantas medicinales. En la sección de herbolaria del mercado, la

estructura vegetativa con mayor demanda son las raíces, aunque también se incluyen a ciertos tallos especializados como son los: cormos, rizomas, bulbos y tubérculos, así como las flores, los frutos, las hojas y corteza (Belluci, 2002; Manzanero *et al.*, 2009).

La Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Nacionales (SEMARNAT) y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), señalaron que el 85% de las plantas medicinales que se comercializan en los mercados nacionales, locales y tiendas naturistas provienen de la recolección silvestre, principalmente de comunidades indígenas y rurales (75%) de la región centro-sur de la República Mexicana (Juárez *et al.*, 2013).

Por ejemplo, en un estudio realizado en cuatro mercados del estado de Puebla, se reportó que en el mercado de Atlixco se encontraron 36 especies, 33 en el mercado de Tepeaca, 25 en el mercado de Hidalgo de la ciudad de Puebla y 10 en el mercado de Tecamachalco. Sólo dos especies la prodigiosa (*Calea zacatechichi* Schltld) y la manzanilla (*Matricaria recutia* L.), fueron halladas en todos los mercados. Algunas especies son de amplia comercialización a nivel regional y nacional como la cancerina (*Hippocratea excelsa* Kunth) y el cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltld) Schiede ex Standl). De las plantas medicinales encontradas en los mercados referidos, se venden principalmente las partes aéreas (tallos, hojas, flores, frutos y corteza), y solamente de 5 especies sus raíces. La presentación del recurso herbolario en los mercados es en forma fresca o seca, así, por ejemplo, la presentación de plantas en fresco, recolectadas en zonas aledañas al mercado como el romero de monte (*Leucophyllum pringlei* Standl.), el árnica (*Heterotheca inuloides* Cass.) y el toronjil (*Agastache mexicana* Kunth). En forma seca, se encuentran principalmente los tallos, frutos, cortezas y raíces, por ejemplo, el palo de corazón (*Serjania* sp.) y del garanjel (*Randia echicocarpa* Sessé et Moc. Ex DC.). Las plantas medicinales que se venden en estos mercados son principalmente recolectadas en su vegetación natural, tanto de matorral xerófilo, bosque tropical caducifolio, bosque mesófilo de montaña y del bosque tropical perennifolio, hecho que puede causar problemas de sobreexplotación y pérdida del recurso. Cuando las partes utilizadas son hojas o frutos, el problema puede ser menor ya que la

planta no es eliminada, pero cuando se utilizan cortezas o raíces, es muy fácil que el recurso sea mal manejado y resulte en abatimiento de las poblaciones, sobre todo cuando hay un aumento en la demanda. Es por esto, necesario diseñar estrategias que permitan la recuperación de dichos recursos (Martínez *et al.*, 2006).

1.1.2 Producción y comercialización de plantas aromáticas y medicinales

Los principales estados productores de plantas aromáticas de exportación y que cumplen con los protocolos de Buenas Prácticas Agrícolas o certificación orgánica son: Morelos, Baja California Sur, Estado de México, Nayarit, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala. Siendo el principal destino el mercado de Estados Unidos de América. Por ejemplo, en Puebla, las plantas medicinales exportadas van dirigidas a la población migratoria de mexicanos. También existen empresas como Hierba Real que exportan algunas plantas medicinales como el epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.), damiana (*Turnera diffusa* Willd), laurel (*Litsea glaucescens* H.B.K), árnica (*Heteroteca inuloides* Cass) y gordolobo (*Gnaphalium oxyphyllum* DC) a la India, Estados Unidos de América, Pakistán, Alemania y Francia (Juárez *et al.*, 2013).

Debido a la creciente demanda nacional e internacional y a que la disponibilidad de las plantas medicinales en los mercados no es constante, especialmente las plantas anuales, para solucionar esta problemática los vendedores secan y almacenan el material vegetal, lo que posibilita su venta durante todo el año; aun así esta actividad se ve afectada cuando en la preparación es necesario utilizar la porción de la planta en fresco (Manzanero *et al.*, 2009). Por ello, se han incrementado los apoyos para producir sistemas de agricultura protegida, su promoción en ferias y exportaciones internacionales. Además, se realizan siembras programadas para mantener controlada la producción, de esta forma no se satura el mercado y no cae el precio (Juárez *et al.*, 2013).

En el 2011 el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca (SIAP) dependiente de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentos (SAGARPA) reportó que de las 8,351 hectáreas destinadas a la producción comercial de plantas aromáticas, el cilantro (*Coriandrum sativum* L) ocupó el 71%,

seguido de la manzanilla (*Matricaria chamomilla* L) y la albahaca (*Ocimum basilicum* L) con un 10 y 5% respectivamente. Los cultivos mejor pagados fueron el comino (*Cuminum cyminum* L) (\$32,685 pesos por tonelada), la menta (*Mentha x piperita* L) (\$22,099 pesos por tonelada) y el cebollín (*Allium schoenoprasum* L) (\$17,367 pesos por tonelada). En lo que se refiere al valor de la producción (precio tonelada) el cultivo más rentable es el tarragón (*Artemisia dracunculoides* Besser) con un valor de \$30,780 pesos por tonelada, le sigue la menta con \$30,000 pesos por tonelada, el cebollín y la salvia (*Salvia pratensis* L) se encuentran por arriba de los \$27,000 pesos por tonelada (Juárez *et al.*, 2013).

Sin embargo, la sobreexplotación, los desplazamientos de cultivos y variedades tradicionales, el crecimiento demográfico, los incendios forestales, la destrucción del hábitat natural, la pérdida del conocimiento asociado a estos recursos, la introducción de especies invasoras y el cambio climático global, han generado una tasa de extinción de recursos de 2 mil 583 especies mexicanas, siendo las plantas el grupo más afectado (939 especies, entre angiospermas y gimnospermas), seguido por los mamíferos (126 especies) y las aves (108 especies) de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010, que se encarga de enlistar las especies y subespecies de flora y fauna silvestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas o raras y sujetas a protección especial y que también establece especificaciones para su protección. Entre 1993 y 2002, la CONABIO informó que México perdió cerca de 2.5 millones de hectáreas de bosques, 837 mil de matorrales xerófilos, 836 mil de selvas y 95 mil hectáreas de humedales. Entre el año 2000 y 2003, la red carretera nacional se amplió en 26 mil 871 km, lo que ha contribuido a la pérdida y deterioro de los ecosistemas terrestres. Para 2005, se reconocían 780 especies invasoras: 647 plantas, 75 peces, 2 anfibios, 8 reptiles, 30 aves y 2 invertebrados (Luna *et al.*, 2011; www.conabio.gob.mx, 2005).

1.1.3 Contexto actual de las plantas medicinales

Los fitomedicamentos han tenido un notable crecimiento, se encuentran a la venta principalmente en farmacias y mercados del país, lo que evidencia su aumento significativo en la demanda mundial por estos productos, en donde las autoridades

sanitarias y la opinión pública se han interesado por la inocuidad y calidad de estos medicamentos (Escalona *et al.*, 2015). También se ha comprobado que algunas plantas que se utilizan con fines medicinales tienen principios activos que se emplean para la elaboración de fármacos comerciales (Mendez, 2000; García *et al.*, 2011). Para avanzar en el conocimiento de la gestión tradicional de los recursos naturales de origen vegetal y de las relaciones entre las sociedades humanas y las plantas, se han realizado estudios etnobotánicos, ya que varias compañías farmacéuticas están interesadas en las plantas con gran potencial, para la obtención de fármacos de origen natural útiles en el tratamiento de enfermedades que afectan a la población mundial. Hecho que ha generado que se cada día se preste más atención al estudio de las especies medicinales de manera tal que la etnobotánica, la fitoterapia y la fitoquímica toman un auge, tanto en la práctica de la medicina complementaria como en el ámbito académico (Escalona *et al.*, 2015).

El análisis químico ha confirmado el conocimiento de los yerberos, pero poco a poco se van perdiendo especies importantes, especialmente aquellas de las cuales se usan las raíces, tronco, corteza o flores. Es evidente que en muchos países la proporción de especies silvestres utilizadas es significativa, lo que pone de manifiesto el posible deterioro de los recursos naturales y la importancia de evaluar el impacto que produce el empleo de las poblaciones naturales y proponer estrategias para su conservación y aprovechamiento sostenible. A partir de todas estas situaciones se hace necesario trabajar en proyectos donde se identifiquen a las plantas medicinales, para su cultivo e investigación con respecto a su valor nutritivo y/o medicinal, para el futuro de la población, valorando así el trabajo maravilloso que realizan las plantas al sintetizar principios activos naturales que contribuyan a prevenir, recuperar y mantener la salud. Así mismo, es necesario incentivar los Biohuertos familiares con plantas medicinales que no requieren sino de un rincón en el hogar y la atención de la familia. Con esto se fomentaría el acercamiento a la naturaleza y la toma de conciencia de los beneficios que ellas brindan (Rendón *et al.*, 2001).

La Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos publicada en 2001 por la Secretaria de Salud, tiene como propósito establecer los lineamientos oficiales

relacionados con el control de calidad, destinados a asegurar la idoneidad de las plantas utilizadas, además, trata de establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y derivados de ellas utilizados en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, contribuir al mejoramiento de la calidad de los productos y su uso adecuado, así como difundir y promover el potencial terapéutico de la flora de México (Ocegueda *et al.*, 2005).

1.2 Especie en estudio: *Tilia americana* variedad *mexicana*

Tilia americana var. *mexicana* crece en diversos tipos de suelo, en andasoles y litoles de bosques mesófilo de montaña, bosque de pino, bosque de encino, entre los 1,300 y los 2,400 msnm. El árbol crece en forma natural en los estados de Chihuahua, Coahuila, Estado de México, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, asociada a alguna de las principales cadenas montañosas de la República Mexicana (Martínez y Matuda, 1979). En México, *Tilia americana* var. *mexicana* es conocida por varios nombres comunes dependiendo de la región donde crece: en Michoacán y Jalisco se les llama cirimo, tila, tilia, tirimo, tzirimo y tzirimu; en Oaxaca, yaca, y yaco; en Morelos e Hidalgo, tilia (Martínez y Matuda, 1979; Martínez, 1969).

Se han descrito 15 árboles de tilio en México con base a las diferencias en la cantidad y el tipo de la pubescencia de la superficie axial de las hojas y se han identificado todos como *Tilia mexicana*; posteriormente, esta especie perteneciente a la familia *Tiliaceae* fue clasificada como una de las cuatro variedades de *Tilia americana*: *Tilia americana* L. var. *mexicana* (Schltd) Hardin, cuya sinonimia es *Tilia mexicana* Schltdl (Brands, 2009; Aguirre *et al.*, 2010).

1.2.1 Descripción botánica

Tilia americana var. *mexicana* es un árbol de tallo recto con corteza lisa de 18 a 35 m de altura y 1 m de diámetro. Presenta follaje vistoso, hojas simples en posición alterna, dentadas o lobulares, de color verde claro a verde oscuro, glabras en el haz, más pálidas y menudamente vellosas en el envés, con nervadura palmeada y nervios secundarios o laterales. Las hojas son de 8 a 14 cm de largo, en forma de corazón, con los lados desiguales en la base y el ápice puntiagudo, de bordes

irregulares dentados. La época de floración se presenta entre los meses de abril a junio. Las flores son fragantes de color blanco con un tono rosado en la parte ventral-dorsal y se tornan amarillentas con la madurez. Presenta un fruto globoso de unos 7 mm, con una o dos semillas viables (Figura 2) (Martínez, 1969).

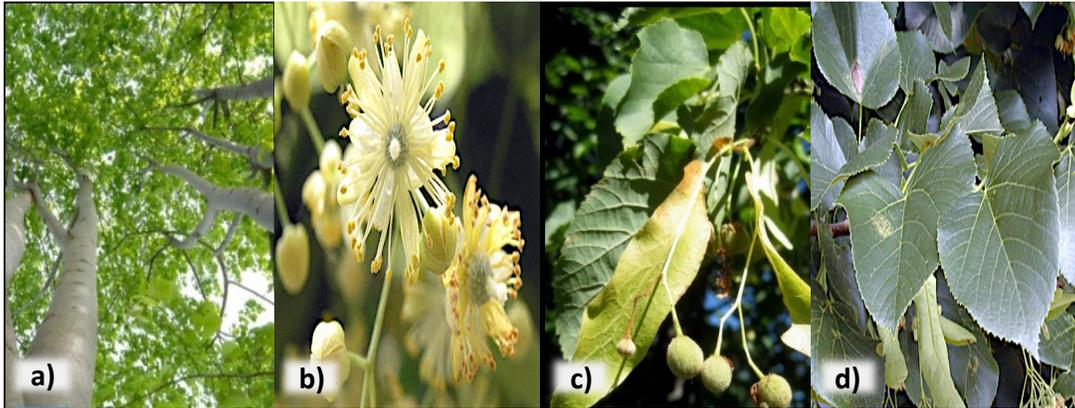


Figura 2. Fotografía de *Tilia americana* variedad *mexicana* y sus diversos órganos: a) tallo, b) flor, c) brácteas y frutos, d) hojas. Tomada de <https://www.google.com.mx/search?q=tilia+americana+var.+mexicana>

1.2.2 Usos medicinales

Los árboles de las especies de *Tilia* se utilizan en todo el mundo por sus propiedades medicinales para el tratamiento de trastornos nerviosos, para conciliar el sueño y contra el dolor de cabeza; para ello se preparan infusiones con las ramas. Estas infusiones también son empleadas como antiespasmódico y contra la tos, como diurético suave, para el tratamiento de la enterocolitis, gastroenteritis, cólicos hepáticos, renales y de la vejiga. El té se bebe cuando se hacen corajes, o se tiene algún padecimiento del hígado y después de la comida para mejorar la digestión (Martínez, 1969; Pavón, 2000; Monroy y Castillo, 2007).

1.2.3 Estudios farmacológicos y químicos

El uso tradicional para el tratamiento de trastornos nerviosos que se le da a la especie *T. americana* var. *mexicana*, ha sido confirmado a través diferentes modelos farmacológicos en roedores. En este sentido, los extractos de hexano y metanol de inflorescencias de *Tilia* aumentaron significativamente la duración del efecto hipnótico inducido con pentobarbital sódico, el cual se observó 15 min después de su administración, sugiriendo que *T. americana* posee actividad

antidepresiva sobre el SNC (Aguirre *et al.*, 2007). Por otro lado, los extractos metanólicos de flores y brácteas contienen diversos glicósidos derivados de quercetina y canferol; al conjunto de estos compuestos se las ha atribuido el efecto ansiolítico. La fracción más activa obtenida de brácteas y flores está compuesta principalmente por la quercetina, canferol y sus glicósidos como el tilirósido y la isoquercetrina; en tanto que, en el extracto hidroalcohólico de hojas se identificaron el tilirósido y la rutina. El efecto analgésico de la infusión de inflorescencias se atribuyó al flavonoide quercetina, con un efecto similar al producido por el antiartrítico comercial Tramadol (Aguirre *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2009).

Los resultados de toxicidad aguda en ratones de los extractos hexánico y metanólico de inflorescencias, indicaron que el extracto metanólico es tóxico con una dosis letal cincuenta (DL₅₀) de 375 mg/kg vía intraperitoneal; la del extracto hexánico fue superior a 2.9 g/kg. En cambio, los ratones mostraron tolerancia a la administración oral de la infusión de las inflorescencias con una DL₅₀ superior a 5 g/kg (Aguirre *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2008).

La actividad ansiolítica de la fracción estandarizada en flavonoides (quercetina, glucósido de quercetina, quercetrina, rutina, canferol y tilirósido), derivada del extracto metanólico de brácteas fue evaluada en interacción con diferentes fármacos serotorinérgicos en el modelo de plus maze elevado. La actividad de la fracción rica en flavonoides fue dosis dependiente y tiene la capacidad de interactuar con el sistema serotoninérgico (Noguerón *et al.*, 2015). Los extractos hexánico, acetato de etilo y metanol de hojas (administrados vía intraperitoneal y/u oral en ratones), demostraron un efecto ansiolítico y sedativo, siendo tan eficaz como las inflorescencias, debido a la presencia de quercetina, rutina e isoquercitrina sugiriendo la participación de los receptores GABAérgicos y serotoninérgicos (Aguirre *et al.*, 2016).

1.2.4 Situación ecológica

La sobreexplotación de los árboles de tila se debe en parte a los usos medicinales, debido a que muchas veces los árboles son derribados para obtener las inflorescencias y las brácteas que se comercializan. Así mismo, el uso de la madera para la fabricación de artesanías ha contribuido importantemente en este proceso. Estas actividades impiden el desarrollo de frutos y semillas, limitando así la propagación sexual e impidiendo el crecimiento y la regeneración de poblaciones naturales. Además, esta especie tiene problemas para su propagación por vía sexual debido que sus 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. Aunado a esto, el hábitat natural de los ejemplares de tila se ha reducido de manera alarmante debido al cambio de uso de suelo y el crecimiento desmedido de las zonas urbanas (Zurita *et al.*, 2014). Por lo anterior, la SEMARNAT ha catalogado esta especie en peligro de extinción con base a la NOM-059-SEMARNAT-2010.

1.2.5 Estudios biotecnológicos

Cultivos celulares: Se ha reportado el establecimiento de cultivos de callos a partir de explantes de hojas de *T. americana* var. *mexicana*. Los callos se desarrollaron en medio de cultivo de MS complementado con 1 o 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.5 mg/L de cinetina (CN). Así mismo, se estableció el cultivo de células en suspensión de esta especie determinando como óptimo el inóculo de 4.5% de biomasa de callos. Los cultivos de células en suspensión produjeron un compuesto con actividad ansiolítica conocido con el nombre de isoquercetrina identificado en el árbol. En las suspensiones celulares también se aislaron e identificaron los compuestos β -sitosterol, ácido ursólico, ácido betulínico, escopoletina y fraxina, los cuales han sido reportados como antiinflamatorios; estos antecedentes permitieron respaldar el uso tradicional de la especie como antiinflamatorio (Gutiérrez, 2015).

Propagación: Los métodos biotecnológicos de micropropagación tienen gran importancia para la preservación y reproducción de genotipos valiosos, permitiendo acortar los procesos reproductivos que requieren mucho tiempo (Chalupa, 2003).

La propagación de *T. americana* var. *mexicana* se ha reportado mediante el enraizamiento de estacas, por la aplicación del enraizador comercial en polvo Radix[®], el cual contiene 10000 partes por millón de AIB empleando como sustrato arena. La óptima proliferación de raíces se registró en tallos de 20 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro, los cuales formaron 3.06 raíces/estaca, de 0.9 cm de longitud y un diámetro promedio de 0.47 cm (Avilés, 2008; Muñoz *et al.*, 2011).

Así mismo, se ha reportado la micropropagación de *T. americana* var. *mexicana*, a partir de semillas desinfectadas superficialmente y con diferentes métodos de escarificación previo al cultivo *in vitro*. Después de 60 días de cultivo el mayor porcentaje de germinación (74%) se obtuvo en semillas tratadas con HCl al 10% durante 5 min. La multiplicación de brotes se obtuvo mediante la siembra de yemas axilares en medio MS con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético en combinación con 6-bencilaminopurina (ANA/BA). El mayor número de brotes (7.75 brotes/explante) se logró con la adición de 0.25 mg/L de ANA en combinación con 1.0 mg/L de BA y los brotes de mayor tamaño (3.53 cm) con 0.10 mg/L de ANA y 0.25 mg/L de BA a los 60 días de cultivo. El enraizamiento de los brotes (100%) se logró en medio MS con con 5.0 mg/L de AIB a los 45 días de cultivo. Las plántulas resultantes lograron una altura de 4.51 cm con 3.3 raíces/plántula de 2.27 cm de longitud; las plántulas fueron transplantadas y aclimatadas en condiciones de cámara de crecimiento, para después ser cultivadas en invernadero. Después de 90 días de cultivo, el 70% de las plántulas alcanzaron una altura de 11.5 cm con hojas y raíces bien desarrolladas (Zurita *et al.*, 2014).

Otras especies de *Tilias* que se han micropropagado a través de cultivo *in vitro*, son la *T. cordata* Mill, al utilizar explantes de yemas axilares cultivadas en el medio de cultivo MS, suplementado con diferentes concentraciones de BA o TDZ, ambas combinadas con 0.1 mg/L de IBA. La concentración de BA (1.0 mg/L) estimuló el mayor número de brotes (7.3) con un alargamiento de 2.2 cm. Los tratamientos con TDZ promovieron la proliferación de brotes de manera significativa. La

concentración de 0.02 mg/L de TDZ generó el mayor número de brotes (16.9 mg/L) de 1.1 cm de longitud (Chalupa, 1987).

La propagación *in vitro* de *T. platyphyllos* Scop., se ha logrado mediante la proliferación de brotes en yemas axilares en medio MS suplementado con glutamina 100 mg/L, hidrolizado de caseína 100 mg/L, 30 g/L de sacarosa, 7 g/L de agar y como reguladores BA o 6-benzilamino-9-(2-tetrahidropiranyl)-9H-purina (BAP) a las concentraciones de 0.1-4.0 mg/L, el TDZ a las concentraciones de 0.001-2.0 mg/L; ambos reguladores se combinaron con 0.1 mg/L de AIB. Después de seis semanas de cultivo, se observó que bajas concentraciones de BA o BAP (0.2-0.5 mg/L) estimularon la elongación de los brotes. El medio de cultivo MS suplementado con una baja concentración de BA o BAP (0.2-0.4 mg/L) en combinación con IBA (0.1 mg/L) promovieron la formación de brotes largos. En el caso del TDZ, bajas concentraciones (0.005-0.01 mg/L) estimularon la formación y desarrollo de yemas axilares. Los brotes elongaron más lentamente en medio conteniendo TDZ y fueron significativamente más pequeños, que aquellos que crecieron en el medio MS con BA o BAP. Los árboles forestales tienen un largo período de generación y la reproducción rápida de genotipos valiosos seleccionados es difícil. Los nuevos métodos biotecnológicos tienen gran importancia para la reproducción de genotipos valiosos, permitiendo acortar los procesos reproductivos que requieren mucho tiempo. El método de proliferación de yemas axilares parece ser un método apropiado para la reproducción rápida *in vitro* de especies de *Tilia*. Las principales ventajas de este método son que las tasas de multiplicación son altas y los cultivos son genéticamente estables (Chalupa, 2003).

1.3 Métodos de propagación sexual y asexual

La propagación de plantas involucra la aplicación de principios y conceptos biológicos enfocados a la multiplicación de plantas útiles de un genotipo específico. Existen dos técnicas de propagación de plantas que pueden conseguirse mediante la siembra de semillas (reproducción sexual) o mediante la multiplicación de tejidos vegetales (reproducción asexual) (Malkun, 2015). Sus principales características son:

Reproducción sexual: Requiere la formación de gametos, en los cuales a través de la meiosis se disminuye a la mitad la cantidad de información genética de los individuos progenitores y de esta manera se forma los gametos haploides de cromosomas. Una vez que ocurre la fecundación (unión del gameto masculino y femenino), se forma el cigoto en el cual se reestablece el número cromosómico original y se produce un individuo diferente genéticamente a sus progenitores (Jiménez y Matías, 2010). La principal ventaja de la reproducción sexual, es que permite la variación por recombinación de caracteres. Esto facilita la aparición de nuevos fenotipos, con características nuevas, algunas de las cuales pueden ser beneficiosas para la especie, ya que se incrementa la velocidad de adaptación o ajuste de las poblaciones a los cambios ambientales; se evita que las mutaciones somáticas desfavorables acumuladas en diversos tejidos de las plantas pasen a la siguiente generación, ya que sólo la información genética contenida en los gametos pasa de una a otra generación. No obstante, esta vía reproductiva tiene sus desventajas, por ejemplo, que los organismos que se reproducen por esta vía lo hacen más lentamente que aquellos que optan por reproducción asexual. Por otro lado, puede considerarse como un fenómeno costoso, ya que además de presentar costos por meiosis, en los que cada hijo recibe la mitad de los genes de cada progenitor, requiere de la inversión de recursos para la formación de gametos (femeninos y masculinos), sino también de otras estructuras como lo son la formación de flores con estructuras como sépalos, pétalos, estambres y sustancias atractivas para los polinizadores. Una vez que se logra la fecundación del gameto femenino, se requiere de recursos y energía destinada a la maduración del embrión y las sustancias que lo nutrirán después de la germinación (Jiménez y Matías, 2010; Seguí, 2014).

Reproducción asexual: Se conservan la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular para generar nuevos individuos con partes vegetativas de la planta (Calderón, 2005; Malkun, 2015; Osuna *et al.*, 2017). La multiplicación se realiza a través de propágulos, que incluyen semillas, segmentos de tejido, yemas, explantes, esquejes o estacas y diversas estructuras especializadas como bulbos, cormos o tubérculos (Osuna *et al.*, 2017). El principio en el que se basa la

propagación de las plantas es el de totipotencia, que es la característica de la célula para reproducir un organismo completo ya que posee toda la información genética necesaria (Hartmann *et al.*, 1997). La multiplicación vegetativa asexual se realiza por la separación de alguno de los órganos de la planta, que posteriormente se convertirá en una planta completa. Se consiguen individuos que presentan todas las características de la planta madre de la cual proceden; por esta razón, se usa para multiplicar las distintas variedades que se quieren conservar sin que se modifique ninguno de sus caracteres. Entre las ventajas biológicas que conlleva están su rapidez de división y su simplicidad (Calderón, 2005). La multiplicación asexual presenta como principales inconvenientes producir una descendencia sin la variabilidad genética, clónica, al ser todos genotípicamente equivalentes a su parental y entre sí (Calderón, 2005; Malkun, 2015).

1.3.1 Métodos convencionales de multiplicación vegetativa asexual

Las principales formas de multiplicación vegetativa asexual son: acodo, injerto y esqueje, de los cuales se mencionan sus características principales a continuación (Malkun, 2015):

Acodo: Es un segmento de la planta que se busca enraizar mientras está aún adherida a ella y de la cual se separa una vez que se origina el sistema radicular. Cuando el acodo ha enraizado, se corta por debajo de ese punto, se planta y ya se tiene una nueva planta independiente e idéntica a la madre. Se puede acodar a la vez hasta el 70% de la copa de una planta o árbol (Figura 3a).

Injerto: El injertar es el arte de unir partes de plantas, de tal manera, que se ligen y continúen su crecimiento como una sola planta. La parte de la combinación del injerto que va a constituirse en la copa o parte superior de la nueva planta se llama púa o injerto y aquella que va a formar la porción baja o la raíz, se le llama patrón o porta injerto. En la preparación de un injerto, el objetivo es conectar o ensamblar dos porciones de tejido vegetal vivo en forma tal que sigan viviendo y que después se comporten como una sola planta. La operación permite combinar las cualidades del injerto y del patrón (Figura 3b).

Esqueje: También conocido como estaca, consiste en separar un fragmento de una planta (tallo, raíz, hoja u órgano especializado) con yemas, y colocarlo en unas condiciones favorables que conlleven la regeneración de una planta completa. Es un método económico, rápido y simple que permite obtener plantas uniformes en superficies reducidas (Calderón, 2005). Es el método más importante para propagar arbustos ornamentales, tanto de especies caducifolias como de especies perennifolias. Dada su capacidad de formar yemas y raíces adventicias, cualquier parte de la planta puede desarrollarse en un organismo vegetal completo e independiente, con las mismas características genéticas de la planta progenitora (Figura 3c). Se recomienda el uso de hormonas de enraizamiento para estimular la división celular y la iniciación de raíces; la respuesta a la hormona depende de la variedad, la concentración y del tipo de aplicación (Ordóñez *et al.*, 2012).

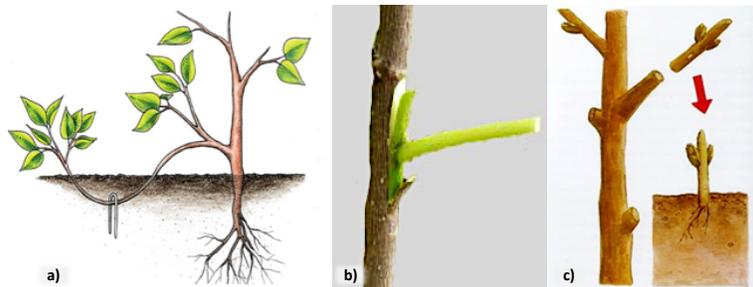


Figura 3. Principales tipos de propagación vegetativa asexual: a) Acodo, b) Injerto y c) Esqueje. Tomado de <https://www.google.com.mx/search?q=acodo-injeto-esqueje>

1.3.2 Cultivo de tejido vegetales

En la producción agrícola moderna, la biotecnología vegetal comprende un grupo heterogéneo de técnicas mediante las cuales un explante o propágulo se cultiva asépticamente en un medio de composición definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Estas técnicas se conocen con el nombre de cultivo de tejidos vegetales (CTV) (Jaimes y Bustamante, 1997).

La técnica de cultivo de tejidos se desarrolla dentro de un frasco de vidrio o plástico transparente, bajo condiciones ambientales controladas y utilizando un medio formulado para el buen desarrollo de los explantes, y se denomina *in vitro* (Roca y Mroginski, 1993).

El CTV, es una técnica de reproducción en condiciones totalmente asépticas, en la que a partir de un segmento pequeño de tejido de cualquier parte de la planta, es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando se le aplica un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo. El CVT involucra el cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. El tamaño del propágulo en el cultivo es tan pequeño que las técnicas de propagación asexual *in vitro* recibe el nombre de micropropagación (Roca y Mroginski, 1993; Hartman *et al.*, 1997).

Mediante la técnica de micropropagación es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas (Albarracín, s.f; Watt, 2012), en periodos cortos de tiempo en espacios reducidos (Roca y Mroginski, 1993). La producción de un cultivo a través de la micropropagación elimina la posibilidad de interrupciones debido a los cambios estacionales, ya que se puede controlar las condiciones de humedad y temperatura en un invernadero. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad en la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc. (Albarracín, s.f). Actualmente, la micropropagación se está aplicando con gran éxito en una gran gama de cultivos hortícolas, ornamentales, frutales y forestales, de los cuales es necesario contar con un gran número de plantas idénticas (Roca y Mroginski, 1993; Seemann, 1993). Los métodos que se utilizan para la micropropagación de plantas *in vitro* son: organogénesis directa e indirecta, embriogénesis somática y cultivo de callos, de los cuales se mencionana sus características principales a continuación: (Roca y Mroginski, 1993; Ayala, 2010) (Figura 4):

Organogénesis directa: El tejido inicial usado es meristemático (apicales, axilares, etc.), la formación de brotes y/o raíces se origina directamente en el explante. La multiplicación de plantas mediante este método asegura la estabilidad genética de las plantas micropropagadas, ya que no presenta cambios dramáticos en la estructura de los tejidos vegetales, la detección de la variación somaclonal puede ser determinada por cambios morfológicos, cariotípicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares (George y Debergh, 2008).

Organogénesis indirecta: El material de partida es tejido diferenciado (segmentos de tallo, hoja, raíz, etc.), a partir del cual, se desdiferencian a células, formando los meristemoides (organogénesis adventicia directa). También, a partir de dicho material, la desdiferenciación da lugar a la formación de callos, a partir del cual se forman brotes, los cuales se enraízan y dan lugar a la planta completa (organogénesis adventicia indirecta). La tasa de multiplicación obtenida por esta técnica es mucho más alta que la organogénesis directa, pero la variabilidad genética puede ser alterada por las concentraciones de los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) (George y Debergh, 2008).

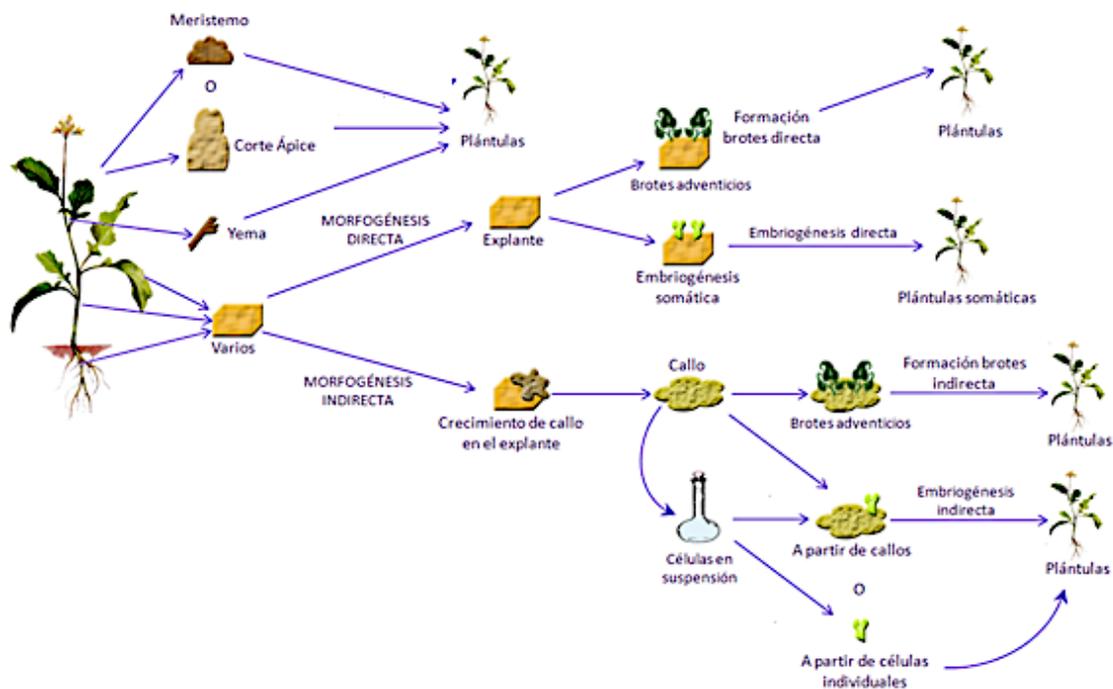


Figura 4. Principales métodos de micropropagación. Tomado de: <https://www.google.com.mx/search?q=Principales+metodos+de+micropropagación>.

Embriogénesis somática: Es la formación de un embrión a partir de una célula somática, que no es un gameto o un producto de la fusión de gametos. El proceso ocurre cuando las células de un explante, cambian su patrón de expresión y genera una estructura bipolar denominada embrión somático. Los embriones pueden formarse de forma directa, a partir de tejidos vegetales diferenciados como secciones de hojas, tallos, etc., o de forma indirecta, previa formación de callo. La formación de embriones somáticos puede tener el inconveniente, de la aparición de

variabilidad genética, sin embargo, la cantidad de plantas que pueden obtenerse por este método puede ser muy alta. La formación de embriones somáticos de forma directa, permite la producción de plantas con menor variabilidad genética que la vía indirecta (Zimmerman, 1993; Nolan y Rose, 2010). Entre los factores que afectan independientemente del método escogido, están el genotipo, el crecimiento estacional de la planta y su edad. El tipo de explante empleado (tamaño, posición y fase de desarrollo), la composición nutritiva del medio de cultivo, la luz y la ventilación del recipiente son otros de los factores que interfieren en el éxito del proceso (George y Debergh, 2008).

La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas (Figura 5). Generalmente las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) de preparación de los explantes para el establecimiento (George y Sherrington, 1984; Roca y Mroginski, 1993; Hartman *et al.*, 1997; Dubos, 2006).

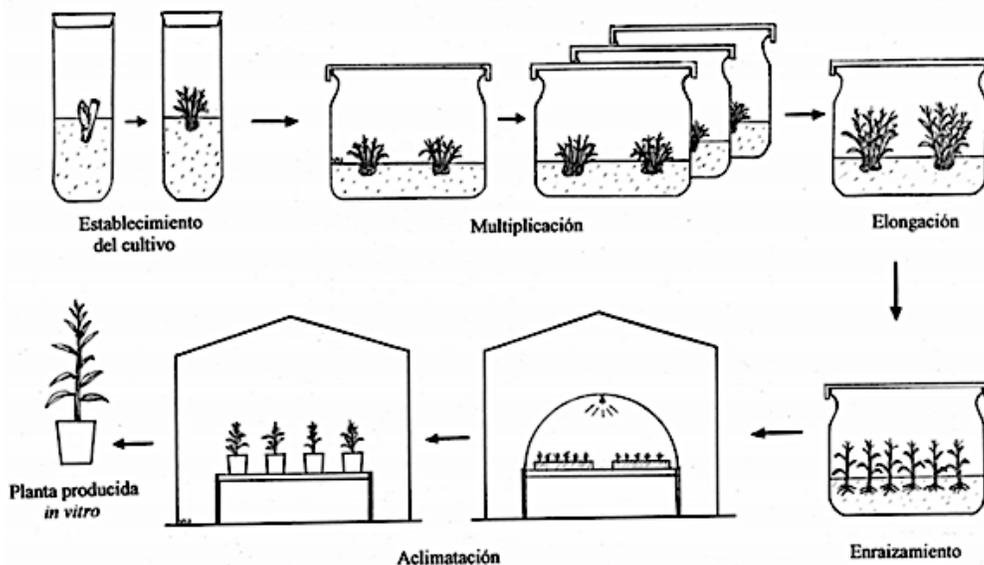


Figura 5. Principales etapas de la micropropagación. Tomada de: <https://www.google.com.mx/search?q=Principales+etapas+de+la+micropropagación+in+vitro>

En la práctica, todos los protocolos de micropropagación se establecen empíricamente sobre una base, que permita determinar los componentes del medio

de cultivo, por ejemplo, los RCV, tipos de nutrientes, las condiciones del medioambiente como son la luz y la temperatura, para cada etapa de la morfogénesis (Watt, 2012).

Cultivo de callos: Un callo es un tejido formando una masa amorfa de tejido como resultado de la proliferación celular continua y acelerada de las células. En las plantas silvestres, el tejido calloso se forma en respuesta a daños mecánicos sufridos por influencia del medio ambiente o por invasión de ciertos microorganismos. En cultivos *in vitro*, la inducción ocurre colocando el explante en contacto con un medio de cultivo y mediante la influencia de RCV que promuevan un crecimiento y una división celular continua. etc.). El éxito de la callogénesis y en consecuencia la subsiguiente regeneración a tejidos y plantas dependen de la calidad del explante usado, que a su vez depende de la planta madre o del tejido del que se inició el cultivo. El inicio de la callogénesis se puede realizar a partir de cualquier órgano vegetal (hoja, raíz, polen, embriones, semillas), sin embargo se prefieren tejidos que contengan células meristemáticas, en los cultivos *in vitro*, estas se encuentran en la periferia de los callos o en suspensiones como masas o nódulos de tejidos preembriónicos, lo que produce una gran variabilidad en la expresión genética entre la población celular de esos cultivos, sin embargo, es importante la presencia de este tipo de células para la regeneración de una planta. Varios autores opinan, que puede ser consecuencia de la alta frecuencia de división celular que tienen los cultivos. Otros indican que pueden ser causadas por alteraciones o cambios de factores epigenéticos. Existen estudios donde se observa que callos establecidos a partir de diferentes órganos pero de una misma planta varían en apariencia y presentan características únicas. Callos procedentes de un mismo explante también difieren en su morfología y características intrínsecas como color o carentes de pigmentos, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación y producción de metabolitos. Hay estudios que demuestran que cualquier cultivo *in vitro* puede alcanzar producciones tan altas o más de un determinado compuesto respecto a las que presenta una planta silvestre (Ángel y González, 2013; Calva y Pérez, 2005).

1.3.3 Reguladores del crecimiento vegetal

Los RCV son sustancias extraídas de los tejidos vegetales y obtenidos por síntesis química, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de alguna manera cualquier proceso fisiológico en plantas (Bidwell, 1983). Los RCV son importantes para el control del crecimiento, no únicamente dentro de la planta, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Wareing y Phillips, 1973).

Son cinco tipos básicos de RCV (Tabla 1) divididos en tres grupos principales, promotores del crecimiento (auxinas, citocininas y giberelinas), inhibidores del crecimiento (ácido abscísico) y el etileno con efectos específicos. De los promotores del crecimiento las auxinas y giberelinas tiene la función de estimular la elongación celular y las citocininas son las encargadas de estimular la división celular (Ayala, 2010).

Tabla 1. Tipos y efectos de reguladores del crecimiento vegetal utilizados en la micropropagación.

Regulador crecimiento vegetal	Siglas	Nombre	Efectos
Auxinas	AIA	Ác. 3-Indolacético	Formación de brotes y raíces adventicias, inducción de embriones somáticos, división celular, formación y crecimiento de callos, inhibición del desarrollo de yemas axilares e inhibición del crecimiento de la raíz.
	ANA	Ác. Naftalenacético	
	AIB	Ác. Indol-3-butírico	
	2,4-D	Ác. 2,4-Diclorofenociacético	
Citocininas	Z	Zeatina	Inhibición de la formación de raíces, división celular, formación y crecimiento del callo, estimulación del desarrollo de yemas axilares, inhibición del alargamiento de la senescencia de la hoja.
	TDZ	Tidiazurón	
	BA	6-Bencilaminopurina	
	KIN	Cinetina	
Giberelinas	GA ₃	Ác. giberélico	Alargamiento del tallo, ruptura de la dormancia de las semillas, embriones somáticos, yemas apicales y bulbos, inhibición de la formación de raíces adventicias.
	GA ₁	Giberelinas	
	GA ₄		
Etileno	-----	-----	Estimula la senescencia de las hojas, la maduración de los frutos, promueve o inhibe la regeneración adventicia en dependencia con el tiempo de aplicación o del genotipo.
Ác. abscísico	ABA	-----	Maduración de embriones somáticos, facilita la aclimatación, formación de bulbos y tubérculos, promueve el desarrollo de la dormancia.

Adaptado de Ayala, 2010.

Los RCV son diferentes tanto en sus características químicas y en su capacidad para inducir respuesta de crecimiento, diferenciación y en muy diversos fenómenos del desarrollo de las plantas, promoviéndolos o inhibiéndolos (Ayala, 2010). Las principales características de las auxinas y citocininas son:

Auxinas: Existen varias auxinas como el ácido indolacético (AIA), presente en la mayoría de las plantas de forma natural, así como las auxinas sintéticas, tales como el 2,4-D, ANA, y AIB. En la planta regulan la dominancia apical, la formación de raíces laterales, el desarrollo de tejidos vasculares, la división, el alargamiento y diferenciación celular. Pueden estimular o inhibir el crecimiento dependiendo de su concentración y localización en la planta (Guilfoyle *et al.*, 1998).

El AIA es la auxina más inestable frente a factores del medio como la luz y temperatura. En trabajos dirigidos a la multiplicación vegetativa, el AIA se reemplaza frecuentemente con AIB o ácido indolpropiónico (AIP). El ANA es una auxina fuerte, muy estable y utilizada especialmente para promover la rizogénesis (Dubos, 2006).

Citocininas: La mayoría de las citocininas naturales y sintéticas son compuestos derivados de la adenina. Tienen amplios efectos regulatorios, pueden promover la división celular, promover el crecimiento de raíces laterales, inhibir la elongación del tallo, el alargamiento de hojas y pueden actuar en el retraso de la senescencia, la dominancia apical, además de tener un papel fundamental en el proceso de la organogénesis (Mock *et al.*, 2000; Zurcher y Muller, 2016).

Las citocininas a concentraciones elevadas también favorecen la formación de nuevas yemas sobre los callos. Pueden utilizarse a concentraciones muy fuerte para favorecer la proliferación *in vitro* de meristemas axilares en el cultivo de ápices y para la obtención de macollos de yemas (Dubos, 2006).

El uso medicinal de las infusiones de *T. americana* var. *mexicana* en el tratamiento de padecimientos que conllevan a un proceso inflamatorio y gastroprotector como son la enterocolitis y gastroenteritis evidencian el potencial químico medicinal de esta especie (Martínez *et al.*, 2009; Cardenas *et al.*, 2014; Angeles *et al.*, 2015; Aguirre *et al.*, 2016). Asimismo, la incorporación de las técnicas de CTV como la micropropagación y la totipotencia de las células en cultivos de callos y células en

suspensión para sintetizar los compuestos activos que produce la planta de la cual derivan, hacen que sean considerados sistemas vegetales potenciales para determinar efectos farmacológicos y realizar su análisis químico para la identificación de compuestos activos. Para ello, es importante conocer la información más relevante del proceso inflamatorio y gastroprotector, que a continuación se revisará.

1.4 Inflamación

Entre las muchas enfermedades que aquejan a la población mundial, las que involucran procesos inflamatorios, por ejemplo, la artritis reumatoide, gota, asma o trastornos neurodegenerativos implican reacciones inflamatorias que en algunos casos son incapacitantes para quienes las padecen. Además, muchas otras dolencias menores que se presentan diariamente involucran procesos inflamatorios como respuesta natural del organismo ante traumas físicos y alergias (Franco *et al.*, 2007).

La inflamación es la respuesta inicial e inmunológica del organismo al daño causado a sus células y tejido vascularizados ante estímulos físicos, mecánicos, biológicos, químicos o microbianos. Es una respuesta rápida, controlada humoral y celularmente, desencadenada por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales, para prevenir la propagación de agentes nocivos y para eliminar células y tejidos necrosados. Es una respuesta benéfica si el proceso inflamatorio mantiene un equilibrio entre células y mediadores (García *et al.*, 2000; García, 2008; Patel y Gowda, 2012).

La inflamación se caracteriza por vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación/adhesión celular e hipercoagulabilidad. La vasodilatación y el incremento de la permeabilidad microvascular en el lugar de la inflamación aumentan la disponibilidad local de nutrientes y oxígeno, produciendo calor, hinchazón y edema tisular. Los cambios hemodinámicos producen los cuatro síntomas clásicos asociados a la inflamación local: rubor (eritema), tumor (edema), calor y dolor (García *et al.*, 2000).

La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas: aguda y crónica. La inflamación aguda es de corta duración (min, h y pocos días) y representa la reacción temprana del cuerpo; se resuelve rápidamente y generalmente es seguida de curación, sus características fundamentales son la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas (edema) y la emigración de leucocitos (principalmente neutrófilos). La inflamación crónica se define como un proceso prolongado y se caracteriza por la presencia de linfocitos y macrófagos, por la proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis (Jaimes, 2009; Patel y Gowda, 2012; León *et al.*, 2015).

1.4.1 Mediadores de la respuesta Inflamatoria

La respuesta inflamatoria aguda comprende una secuencia de eventos importantes, así como los mecanismos estructurales y moleculares que son la base a estos procesos, así como a distintos mediadores químicos. Los principales mediadores químicos son: histamina, serotonina, citocinas, moléculas de adhesión y mediadores específicos, cuyas características se mencionan a continuación:

Histamina: Es una amina producida por basófilos y células cebadas, en respuesta a una lesión celular inespecífica. Es un mediador químico del proceso inflamatorio que estimula la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la adhesión leucocitaria, cuya acción es mediada por tres tipos de receptores (H_1 , H_2 y H_3).

Serotonina: Se encuentra en las plaquetas y su liberación se estimula cuando las plaquetas se agregan tras su contacto con el colágeno, la trombina, el adenosín difosfato (ADP) y los complejos antígeno-anticuerpo estimulando la permeabilidad vascular.

Citocinas: Los macrófagos y monocitos son activados por la agregación plaquetaria y sus mediadores quimiotácticos, o directamente por los productos bacterianos (endotoxinas) o los subproductos de la agresión (opsoninas). Los macrófagos activados producen un amplio espectro de mediadores y las citocinas son los mediadores más importantes en el inicio de esta respuesta, especialmente el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y la Interleucina 1 beta ($IL-1\beta$), considerados determinantes fisiopatológicos de la sepsis y shock séptico.

Estas citocinas actúan sobre las células del estroma, los fibroblastos y el endotelio, induciendo la producción de una segunda ola de citocinas, IL-6, IL-8 y la proteína quimotáctica del macrófago (MCP, por sus siglas en inglés), así como eicosanoides, factor activador de plaquetas (FAP), óxido nítrico (NO), y las citocinas antiinflamatorias (IL4 e IL10) que disminuyen la producción de $TNF\alpha$ e IL-8. La IL-8 y el MCP son altamente quimiotácticos para granulocitos y monocitos que son, fuente de citocinas y de elementos quimiotácticos. En el endotelio, estas citocinas favorecen la expresión de moléculas de adhesión (integrinas, selectinas y adherinas) para los monocitos y neutrófilos, permitiendo su posterior migración tisular. La liberación de radicales libres y la producción de NO por las células endoteliales, junto con los derivados del ácido araquidónico (AA) o eicosanoides (tromboxanos, prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LTs)), generan una reactividad vascular anómala con vasodilatación y extravasación características del fenómeno inflamatorio. La oxidación de los ácidos grasos mediada por la oxidación del AA produce un grupo de compuestos denominados eicosanoides, los cuales actúan como reguladores en los procesos inflamatorios. Los eicosanoides se clasifican en función de la enzima que interviene en su síntesis: tromboxanos y PG producidos por la ciclooxigenasa (COX), así como, LTs y lipoxinas (LX) producidos por las lipooxigenasas (LOX). De las ciclooxigenasas se conocen dos formas denominadas COX-1 y COX-2. La COX-1 es constitutiva (constante) y es esencial para el mantenimiento del estado fisiológico normal de muchos tejidos, incluidos la protección de la mucosa gastrointestinal, control del flujo sanguíneo renal, homeostasia, respuestas autoinmunes, funciones pulmonares, del sistema nervioso central, cardiovascular y reproductivo (Choyillas, 2000; García *et al.*, 2000; León *et al.*, 2015). Mientras que la COX-2 es inducible por varios estímulos por citocinas, endotoxinas y factores de crecimiento, produciendo PGs inductoras, que contribuyen al desarrollo del edema, rubor, fiebre e hiperalgesia (Batlouni, 2010). Se ha comprobado que la activación del factor nuclear-kappa B ($NF-\kappa B$) está implicada en el incremento de la expresión de esta enzima. El producto final de la ciclooxigenasa es un endoperóxido (PGH_2) que por la acción de isomerasas es

transformado en PGs, cuyo principal efecto sobre la inflamación es incrementar la vasodilatación (Choyillas, 2000; García *et al.*, 2000; León *et al.*, 2015).

Por otro lado, la ruta mediada por la enzima llamada LOX da origen a los LTs y a LXs. Existen varias LOXs de las cuales las 5-, 12- y la 15-lipoxigenasas (5-LOX, 12-LOX y 15-LOX) son las principales, que están presentes en leucocitos, plaquetas y células endoteliales. La enzima 5-LOX es la responsable de la formación de sustancias anafilácticas de reacción lenta (vinculadas con procesos alérgicos), entre ellas los leucotrienos: LTC₄, LTD₄ y LTE₄ y factores atractores de neutrófilos y eosinófilos como el LTB₄ (Cantú *et al.*, 2017). La biosíntesis de los LTs se produce por acción de la enzima 5-LOX, que usa a la proteína activadora de la 5-LOX para introducir un oxígeno en el AA y, así lo convierte en el ácido hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE), posteriormente se reduce y genera al ácido hidroxieicosatetraenoico (HETE). Esta misma enzima, actúa sobre HETE para transformarlo en el leucotrieno A₄ (LTA₄), que puede ser convertido a LTB₄ por la enzima A₄ epóxido-hidrolasa. La enzima leucotrieno C₄ sintetasa conjuga el glutatión con LT₄ para producir LTC₄, que es transportado al exterior de la célula, donde el grupo funcional del ácido glutámico es extraído para generar al LTD₄. Ciertas peptidasas cortan al LTD₄ para formar LTE₄. Los LTs juegan un papel importante en la inflamación, son broncoconstrictores, incrementan la permeabilidad vascular y vénulas postcapitulares, y estimulan la secreción de moco. Son sintetizados en diversas células del organismo como: neutrófilos, eosinófilos, monocitos, mastocitos, macrófagos alveolares, células epiteliales y endoteliales de los vasos pulmonares. Por otro lado, existe un rol neuroendocrino para el LTC₄ en la secreción de la hormona luteinizante. En neutrófilos el LTB₄ causa adhesión celular, quimiotaxis de leucocitos, estimula la agregación, liberación enzimática de hidrolíticos y generación de ión superóxido (Baños *et al.*, 2015). Por el contrario, los LTD₄ y LTE₄, también conocidos como cisteinil-LTs, son potentes vasoconstrictores que incrementan la permeabilidad vascular y la secreción de mucus (Lewis *et al.*, 1990).

Las LXs se sintetizan por dos rutas biosintéticas distintas. La primera ocurre en los eosinófilos, los monocitos y las células epiteliales pertenecientes al tracto

resporatorio, gastrointestinal y cavidad bucal, y consisten en la oxigenación del AA en el carbono 15 (C-15) por la enzima 15-LOX, generando al ácido 15-S-hidroperoxi-eicosatetranoico (15-S-HPETE) que es captado por los leucocitos polimorfonucleares y/o monocitos para convertirlo en ácido 5,6-epoxitetraeno y luego es hidrolizado para formar los compuestos activos llamados lipoxina A₄ (LXA₄) y lipoxina B₄ (LXB₄). La segunda ruta biosintética de las LXs es dependiente de LTA₄. La enzima 5-LOX contenida en los leucocitos convierte al AA en LTA₄, que es captado por las plaquetas y, por acción de la enzima 12-LOX es convertido a LXA₄ y LXB₄ (Cantú *et al.*, 2017). Estos agentes, son importantes mediadores de la inflamación, aumentan la liberación de anión superóxido (O⁻)₂ en neutrófilos (que es un tóxico celular) y producen degranulación de estas células con liberación de enzimas lisosomales como la elastasa, la cual produce agregación leucocitaria, importante en los procesos inflamatorios (Busse y Gaddy, 1991).

Moléculas de adhesión: Están determinadas por la fijación de moléculas a la superficie de los leucocitos y endotelios. Los receptores de adhesión corresponden a selectinas, inmunoglobulinas e integrinas. Su mecanismo de adhesión a los leucocitos en la inflamación es: La P-selectina se encuentra en la membrana de gránulos intracitoplasmáticos y es estimulada por la histamina, trombina y FAP, la P-selectina se redistribuye hacia la superficie celular, en donde puede fijar a los leucocitos. La E-selectina, es inducida por la IL1 y TNF α , y actúa como mediador de la adhesión de neutrófilos, monocitos y ciertos linfocitos al unirse a sus receptores. Para la fijación de integrinas, la beta integrina (LFA-1) se adhiere a la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (MAIC-1), los neutrófilos deben ser activados, haciendo que la LFA-1 pasa de un estado de baja afinidad a uno de elevada afinidad por la MAIC-1, debido a un cambio configuracional. Los agentes principales que causan la activación leucocitaria son las quimiocinas, elaboradas por el endotelio o por otras células en la zona de lesión. Durante la inflamación, el aumento de la afinidad de la FNA-1 y el incremento de la expresión de MAIC-1 determina las condiciones necesarias para que se produzca la unión leucocito-endotelio.

Mediadores específicos: La respuesta inmunológica específica es realizada por los linfocitos B y T tras la estimulación antigénica, especialmente por agentes infecciosos. Los linfocitos B maduran y se diferencian de células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas o anticuerpos, siendo la respuesta muy específica. Los linfocitos T responden a los antígenos que le son presentados por las células de la serie monocito/macrófago (y otras células presentadoras de antígenos) en conjunción con los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (antígenos HLA). La especificidad de la respuesta se inicia en el receptor para el antígeno (TcR), y las moléculas sintetizadas, linfocinas o mediadores linfocitarios, por los linfocitos CD4, inducen la activación y diferenciación de otros linfocitos, especialmente las células citotóxicas (CD8), las células natural killer (NK) y los linfocitos B.

Las linfocinas son proteínas de bajo peso molecular y vida media muy corta. Su síntesis es rápida, y desempeña un papel regulador de la amplitud y duración de la respuesta inmunitaria. Algunas citocinas como la IL-2 y el IFN γ , son imprescindibles para la respuesta antiinfecciosa ante gérmenes intracelulares (virus, hongos, parásitos) y en la respuesta antitumoral; otras linfocinas estimulan la maduración de las células precursoras hematopoyéticas (IL-3, G-CSF, M-CSF, GM-CSF) y activan la maduración de los linfocitos B (IL-4, IL-5). La función reguladora-supresora de la respuesta inmune depende del balance entre la síntesis de distintas citocinas con acciones diversas (Choyillas, 2000; García *et al.*, 2000; León *et al.*, 2015).

1.4.2 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) se encuentran entre los medicamentos más prescritos en todo el mundo (Batlouni, 2010). Los AINEs son fármacos que se utilizan principalmente en el tratamiento de la inflamación, dolor y edema, así como también en la osteoartritis, artritis reumatoide y disturbios musculoesqueléticos; poseen propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas, ampliamente utilizados por prescripción médica como por automedicación, lo que genera un problema de salud pública y ambiental (Rodríguez *et al.*, 2015) (Tabla 2).

Su mecanismo de acción lleva a efectos beneficiosos en numerosos cuadros clínicos y a efectos adversos que en ocasiones son graves y que quizá los consumidores habituales no conocen (Batlouni, 2010; Aranguren *et al.*, 2016). No producen depresión respiratoria y no inducen tolerancia ni dependencia física (Rivera, 2006).

Tabla 2. Clasificación de los principales AINEs.

Antiinflamatorio no esteroideo	Fármaco	Posología	Dosis máxima por día
Salicilatos	Ácido acetilsalicílico	500 mg/4-6h	4 g
	Naproxeno	550-1100 mg/d	1100 mg
Propiónicos	Ibuprofeno	400-600 mg/d	2.400 mg
	Ketoprofeno	50 mg/12-6 h	200 mg
		50 mg/8-12 h	150 mg
Acéticos	Diclofenaco	10 mg/4-6 h	40 mg
		25 mg/6-12 h	40 mg
	Ketorolaco	75 mg/12-24 h	200 mg
		7.5-15 mg/d	15 mg
Antranílicos	Ácido mefenámico	500 mg/8 h	1.500 mg
	Inhibidores selectivos de la COX-2	Celecoxib	200 mg/24 h
Etoricoxib		30-120 mg/24 h	60-120 mg

Adaptado de Aranguren *et al.*, 2016

Los AINEs actúan inhibiendo la transformación del ácido araquidónico en PG mediante la inhibición de las enzimas COX. La inhibición de estas enzimas afecta a funciones fisiológicas gastrointestinales, cardiovasculares y renales, de forma que los mismos mecanismos de acción responsables de los efectos beneficiosos también generan diferentes riesgos (Aranguren *et al.*, 2016). Los AINEs interfieren la activación de los neutrófilos, afectando a la quimiotaxis migración y liberación de

los productos leucocitarios (enzimas lisosomiales) de los que deriva parte de su poder antiinflamatorio (Valdivielso, 1998).

Estos AINEs presentan efectos inhibitorios variados con relación a la COX-1 y COX-2, así como a los efectos colaterales en el tubo digestivo. La aspirina es aproximadamente 166 veces más potente como inhibidor de la COX-1 en relación a la COX-2. La aspirina acetila e inhibe irreversiblemente la isoenzima COX-1, lo que conlleva la inhibición plaquetaria completa, por el tiempo de vida de las plaquetas. Otros AINEs como naproxeno, ibuprofeno y piroxicam, inhiben de forma variable a la COX-1 y COX-2, provocando inhibición plaquetaria reversible (Batlouni, 2010).

1.4.3 Modelos farmacológicos de evaluación antiinflamatoria

Los modelos animales se usan para estudiar el desarrollo y evolución de las enfermedades y para probar nuevos tratamientos antes de ser administrados a los seres humanos. Dentro de los modelos experimentales, el ratón es el más conocido y utilizado en la mayor parte de las experiencias *in vivo* de la biología y medicina, es el modelo elegido para conocer la reacción de un organismo mamífero frente a una agresión, intoxicación, infección, reacciones o trastornos inmunológicos, oncología, teratología y embriología (Hernández, 2006). Existen varios tipos de protocolos en función de la forma de aplicación, agente irritante utilizado o duración del proceso inducido. Los métodos pueden ser utilizados entonces bajo los siguientes parámetros (Jaimes, 2009):

- ❖ **En función de la forma de aplicación:** Se emplean métodos que provocan una irritación tópica, aguda o subcrónica y son válidos para el estudio de sustancias activas en procesos inflamatorios de piel y mucosas. La administración oral o parenteral es útil para el estudio de agentes de efecto sistémico, independientemente del agente irritante.
- ❖ **El agente irritante:** Varía en función del modelo que se quiera mimetizar, puede ser ácido araquidónico (AA), 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA),

serotonina (5-HT), histamina, carragenina, bradicinina (BK), entre otros. De administración tópica y parenteral.

- ❖ **La duración del proceso y del tratamiento:** En algunos procesos agudos se cuantifica el edema inducido, que a veces dura minutos y en otras horas. Otros procesos inducen una auténtica inflamación, por lo que además del edema se pueden valorar otros parámetros, como enzimas inducidas, o mediadores liberados.

Los modelos para la evaluación antiinflamatoria son importantes para monitorear la evolución del proceso inflamatorio experimental, el cual se puede realizar *in vivo* e *in vitro*. Los principales modelos para evaluar la inflamación aguda y subaguda de las sustancias son los que se mencionan a continuación (Jaimes, 2009; Patel y Gowda, 2012):

- ❖ Eritema UV en cobayos.
- ❖ Permeabilidad vascular.
- ❖ Edema auricular inducido por oxazolona en ratones.
- ❖ Edema auricular inducido con aceite de crotón en ratas y ratones.
- ❖ Edema subplantar en ratas (diversas modificaciones y diversos irritantes).
- ❖ Técnicas específicas (Técnica de Edwards, Técnica de Sedwick).

Edema auricular inducido con TPA: El aceite de crotón contiene TPA y otros ésteres de forbol como agentes irritantes. El TPA es capaz de activar a la proteína quinasa C (PKC) dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos, las cuales activan otras cascadas enzimáticas, como las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), PA2, lo que libera al PAF y AA. Esta cascada de eventos estimula la permeabilidad vascular, vasodilatación, migración de leucocitos polimorfonucleares, liberación de histamina y serotonina, síntesis moderada de eicosanoides por las enzimas COX y 5-LOX. La liberación de inhibidores COX y 5-LOX, antagonistas de leucotrienos B4 y corticoides muestran una acción antiinflamatoria tópica en

modelos animales inducidos con TPA en la inflamación de la piel (Jaimes, 2009; Patel y Gowda, 2012).

El estudio bioquímico demuestra un incremento de AMPc, PGE2 y PGE2a, además de actividad de la enzima ornitín-descarboxilasa y de síntesis proteica. Los fármacos de referencia más adecuados son los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, como indometacina, aunque los inhibidores de la COX, LOX y PLA2 dan buenos resultados, además de corticoides y antihistamínicos. La ventaja del método es la rapidez y poca muestra necesaria para desarrollar un estudio e incluso una curva dosis efecto. El principal inconveniente radica en la falta de selectividad, ya que un elevado número de fármacos y sustancias objeto de análisis suelen dar resultados positivos en este test. Otro problema adicional es que el fármaco se administra conjuntamente con el irritante, lo que permitiría conocer un grado de protección y no de curación real (Jaimes, 2009).

1.5 Úlceras gástricas

El estómago comunica el esófago con el intestino delgado, actúa como reservorio y además secreta grandes cantidades de HCl y pepsina hacia el lumen y gastrina hacia la sangre, cuyo objetivo es digerir los alimentos, absorber ciertas sustancias y vaciar pequeñas cantidades de quimo hacia el intestino delgado, donde continúa el proceso de digestión (Figura 6a). Es considerado una de las primeras barreras antibacterianas del tubo digestivo. El control de estas secreciones tiene regulación mediante receptores mecánicos y químicos presentes en el estómago y el duodeno (Toso y Skliar, 2000).

El estómago está recubierto de tres tipos principales de tejidos: mucosa pilórica, mucosa propia gástrica (oxíntica) y mucosa del cardias (Figura 6a-b). La mucosa pilórica recubre la porción aboral del estómago simple. La mucosa propia gástrica se funde con la mucosa del cardias cerca de la unión gastroesofágica (Toso y Skliar, 2000).

La mucosa propia gástrica contiene las glándulas tubulares compuestas que secretan HCl (células parietales u oxínticas) y pepsinógeno de las células pépticas o principales (Figura 6c). Esta área de la mucosa tiene importancia fundamental en

el proceso digestivo gástrico. Las región pilórica también contiene a la célula de gastrina (célula G), la cual, con estímulo adecuado, libera gastrina hacia la sangre (Toso y Skliar, 2000).

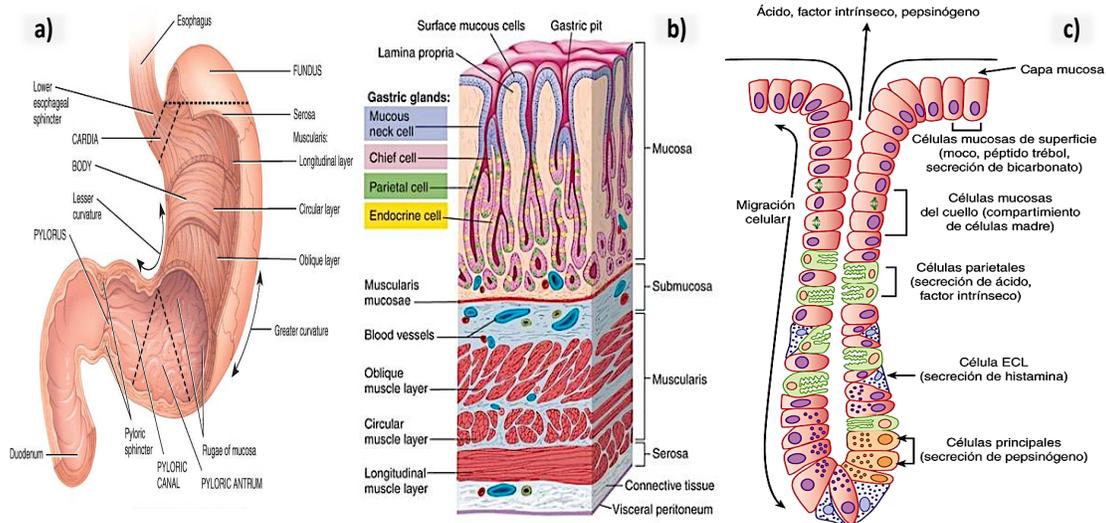


Figura 6. Estómago: a) Partes, b) Capas y c) Glándula gástrica. Tomada de: <https://www.google.com.mx/search?q=Estomago+y+sus+partes+glandula+gástrica>

1.5.1 Mecanismos de control de la secreción gástrica

Los mecanismos de regulación de la secreción gástrica pueden dividirse para su estudio en tres fases: cefálica, gástrica e intestinal, sin embargo, no existe una desvinculación entre ellas (Toso y Skliar, 2000; Lanás, Fernández y Sáinz, s.f.):

Fase cefálica: Es el resultado de un estímulo central derivado de la vista, olfato, sabor, masticación o deglución de los alimentos. En el hombre el mayor estímulo se logra con los estímulos visuales o el recuerdo de ciertos alimentos. Esta respuesta depende del nervio vago a partir de una descarga posganglionar de acetilcolina la cual estimula a la célula parietal, mientras que el nervio vago causa la liberación de gastrina de las células G. La bombesina es el intermediario de este efecto al liberarse de los nervios entéricos. La gastrina, además, estimula la célula parietal para que segregue ácido. Por otro lado, la liberación de somatostatina inhibe la liberación de gastrina de la célula G por un efecto paracrino, mientras el estímulo vagal inhibe la liberación de somatostatina eliminando el efecto supresor de ésta sobre la liberación de gastrina (figura 7a) (Toso y Skliar, 2000; Cienfuegos, 2010).

Fase gástrica: Incluye reflejos nerviosos vagales y locales que responden a la distensión gástrica. La gastrina, estimula a las parietal para secretar ácido clorhídrico. Por otro lado, la liberación de somatostatina inhibe la liberación de gastrina de las células G por un efecto parácrino, mientras el estímulo vagal inhibe la liberación de gastrina. Las células G poseen quimiorreceptores que responden a péptidos o aminoácidos en el lumen gástrico (Figura 7b) (Toso y Skliar, 2000; Cienfuegos, 2010).

Fase intestinal: Esta fase aporta solo una pequeña porción de secreción gástrica de HCl ante la presencia de alimento en el duodeno. Una o más hormonas liberadas por la mucosa duodenal estimulan la secreción gástrica. Una de éstas es probablemente la gastrina intestinal, la cual está presente en la mucosa duodenal. La fase intestinal también contiene un componente colinérgico para estimular la secreción gástrica (Figura 7c) (Toso y Skliar, 2000; Cienfuegos, 2010).

La secreción de ácido en el estómago al comer disminuye el pH con el tiempo. Cuando el pH del contenido gástrico se aproxima a 2.0, la liberación de gastrina se suprime casi totalmente. Estos fenómenos impiden la secreción gástrica continua de ácido. El mecanismo que inhibe la liberación de gastrina es la liberación de somatostatina al actuar la acidificación del antro en las células endocrinas de la mucosa glandular pilórica (Toso y Skliar, 2000).

La inhibición proveniente del intestino ocurre en respuesta a la presencia de ácidos, grasas y soluciones hipertónicas. Así, los mismos estímulos que inhiben el vaciamiento gástrico también inhiben la secreción gástrica. Hay pruebas de inhibición nerviosa y hormonal. El vago hace sinapsis con las fibras inhibitorias de la liberación de gastrina. Según la especie, la secretina y la colecistocinina pueden participar en la respuesta inhibitoria y estas dos hormonas son capaces de potenciar la acción inhibitoria de cada una. La inhibición hormonal se manifiesta mediante la ocupación competitiva de receptores de gastrina en la célula parietal (Toso y Skliar, 2000; Lanas, Fernández y Sáinz, s.f.).

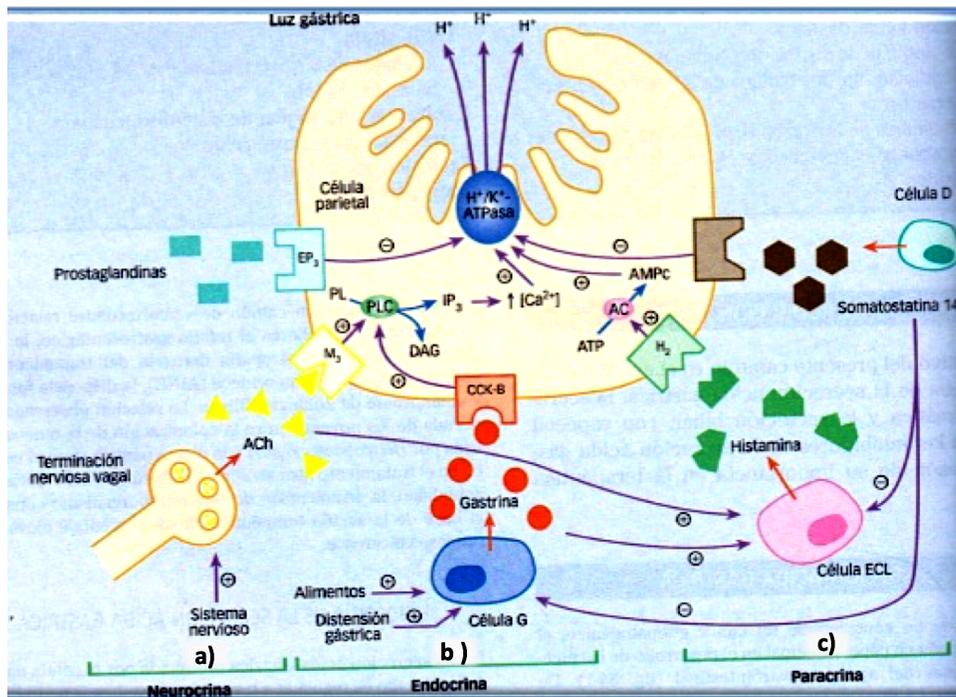


Figura 7. Mecanismo de secreción de ácido HCl: a) Fase cefálica, b) fase gástrica y c) fase intestinal. Tomada de: <https://www.google.com.mx/search?q=mecanismo+de+secreción+de+HCl>

1.5.2 Barrera mucosa gástrica

La barrera mucosa es una propiedad de la mucosa gástrica que impide la difusión de ácido desde la luz hasta el interior de la mucosa e impide la difusión del ión sodio desde el espacio intersticial hasta la luz gástrica. Para evitar la difusión retrógrada del ion hacia los tejidos circundantes esta barrera utiliza varios mecanismos (Toso y Skliar, 2000):

- ❖ La resistencia eléctrica de la membrana celular apical y de los complejos de unión del área de la glándula oxíntica es extremadamente grande. Esta resistencia, junto con el potencial eléctrico negativo del lumen, restringe el movimiento pasivo del ion H⁺. La diferencia de potencial a través de la mucosa se toma como un índice del buen funcionamiento del complejo mucosal/barrera mucosa ya que se ha relacionado con la capacidad regenerativa de las células.

- ❖ La superficie y las células del cuello secretan moco en respuesta a acetilcolina y al estímulo mecánico para formar una capa inmóvil adyacente a la mucosa. El moco gástrico es un gel viscoso con un 5% de glucoproteínas y un 95% de agua. Un déficit en la síntesis de glucoproteínas conduciría a una disminución de la viscosidad.
- ❖ El epitelio de la superficie secreta iones bicarbonato y éstos quedan atrapados en el gel mucoso. Los iones H^+ que se difunden del lumen hacia el epitelio, se neutralizan en esta zona y su concentración se aproxima a cero cerca del epitelio.
- ❖ Las prostaglandinas endógenas, que se originan a partir de los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana celular, parecen ser importantes en la defensa de la mucosa gástrica. Aunque no se conoce el mecanismo preciso por el que las prostaglandinas protegen al epitelio, ciertos efectos, como el aumento del flujo sanguíneo de la mucosa y el estímulo de secreción de bicarbonato por células de la superficie, son probablemente importantes. Además, estos compuestos pueden conferir cierto grado de "citoprotección" directa a la mucosa.

Aunque estos mecanismos proporcionan normalmente una barrera eficaz contra el ión H^+ y la pepsina, el funcionamiento del estómago y su regulación puede alterarse por determinadas circunstancias dando lugar a una serie de enfermedades, entre las más comunes están las úlceras (Toso y Skliar, 2000).

1.6 Úlcera péptica

Las úlceras son lesiones profundas que consisten en interrupciones de la pared gástrica, que penetran a través de la muscularis de la mucosa hasta el interior de la submucosa o más profundamente. Esta enfermedad afecta a los humanos como a los animales. Los datos epidemiológicos de esta enfermedad y sus complicaciones han mostrado que la incidencia de la úlcera aumenta debido al tabaquismo, el alcohol, infecciones por *Helicobacter pylori* y la ingesta de medicamentos AINEs (Toso y Skliar, 2000; Boligon *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2012; Arroyo *et al.*, 2013).

Los pacientes de úlcera péptica (90%) presentan usualmente dolor epigástrico ardor asociado a otros síntomas como náuseas, vómitos, tos, meteorismo y en ocasiones

pérdida de peso. Este dolor es usualmente localizado, no irradiado, dando inicio cuando el estómago se encuentra vacío (2-5 h), después de la ingesta de comida. El dolor se alivia con la ingesta de comida o con el uso de antiácidos. El 66% de los pacientes suelen despertarse entre 12 y 3 AM refiriendo dolor epigástrico y un 46% de los pacientes presenta síntomas de reflujo gastroesofágico como: pirosis, dolor torácico, disfagia y reflujo, en probable asociación de dicha enfermedad. Pacientes con edad avanzada tienen menor probabilidad de presentar síntomas, pero aumentan el riesgo de complicaciones como: perforación, hemorragia y obstrucción. La sintomatología más común en pacientes mayores a 80 años es: dolor epigástrico (74%), náuseas (24%) y vómitos (20%) (Camacho, 2014). Algunos también pueden experimentar sangre en las heces (heces negras) que indican sangrado gastrointestinal (Kaur *et al.*, 2012).

Las úlceras pépticas generalmente se localizan en la curvatura menor del estómago en las proximidades del límite de la mucosa corporal y antral (Toso y Skliar, 2000). La base de la úlcera péptica es lisa y brillante debido a la digestión de todo el exudado. Suelen observarse vasos trombosados que pueden ser la fuente de hemorragias. La mayoría de las úlceras sufre una retracción fibrosa de los bordes, de tal manera que la mucosa circundante se contrae en forma de rayos que se irradian desde el cráter. Las zonas adyacentes se presentan edematosas y enrojecidas debido a la presencia de gastritis. El aspecto microscópico varía desde necrosis activa, pasando por inflamación crónica con cicatrización, hasta curación. En las úlceras activas con necrosis se visualizan cuatro zonas (Toso y Skliar, 2000):

- 1) La base y los márgenes, con una fina capa superficial de detritus fibronecróticos, no visibles macroscópicamente.
- 2) Debajo de esta capa está la zona de infiltración celular no específica, con predominio de neutrófilos.
- 3) En la base de la úlcera existe una zona activa de tejido de granulación.
- 4) El tejido de granulación está sobre una cicatriz fibrosa o de colágeno.

La profundidad de las úlceras varía desde lesiones superficiales, que sólo interesan a la mucosa, a profundamente excavadas y penetrantes. Puede ocurrir la perforación completa de la pared del estómago pudiendo ser ésta una perforación libre hacia la cavidad peritoneal o su base estar formada por otros órganos adheridos como el páncreas, hígado o grasa del epiplón (Toso y Skliar, 2000).

Existen diferentes tipos de úlceras pépticas siendo las más importantes la úlcera gástrica, que aparece por daños en el revestimiento del estómago, y la úlcera duodenal, que está asociada con una secreción excesiva de ácido por el estómago (Figura 8) (Kaur *et al.*, 2012).

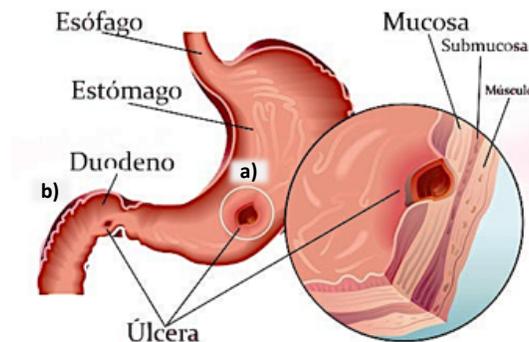


Figura 8. Tipos de úlcera péptica: a) gástrica y b) duodenal. Tomada de: <https://www.google.com.mx/search?q=tipos+de+úlcera+péptica>

1.6.1 Úlceras gástricas

El desarrollo de úlceras gástricas es un proceso complejo y multifuncional que ocurre por un desequilibrio entre factores agresivos (*Helicobacter pylori*, AINEs, secreción de ácido gástrico) y por los factores protectores (mucina, bicarbonato, prostaglandinas), lo que lleva a una interrupción en la integridad de la mucosa (Kaur *et al.*, 2012; Amaral *et al.*, 2013, Boligon *et al.*, 2014). Otros factores que juegan un papel importante en la patogénesis de la úlcera gástrica, son el estilo de vida sedentario, la ingesta de alcohol, la comida picante, las drogas, el tabaco, el estrés, las deficiencias nutricionales, diversas infecciones bacterianas y las especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente aniones superóxido, radicales hidroxilo y peróxidos lipídicos, que afectan directamente las funciones celulares y promueve el daño de los orgánulos celulares en las células, incluidas las mitocondrias, los lisosomas y el núcleo (Molero *et al.*, 1997; Kaur *et al.*, 2012; Boligon *et al.*, 2014).

Para eliminar a las ROS, las células gástricas tienen varios antioxidantes enzimáticos, incluyendo catalasa, superóxido dismutasa, glutatión endógeno y grupos sulfhidrilo, la generación excesiva de ROS agota a estas enzimas antioxidantes (Boligon *et al.*, 2014). La ulceración gástrica puede localizarse en cualquier parte de la mucosa gástrica, a diferencia de las úlceras pépticas, que tienen predilección por determinadas zonas de esa mucosa (Figura 9a). Generalmente se trata de múltiples cuya profundidad va desde una simple erosión que consiste en la descamación del epitelio superficial (Figura 9b), hasta lesiones más profundas en todo el espesor de la mucosa llamadas ulceraciones (Figura 9c). Las lesiones más superficiales son, en esencia, una extensión de la gastritis aguda erosiva mientras que, las más profundas, son úlceras bien definidas, aunque no se trata de precursores de úlceras pépticas, pues tienen una biopatología totalmente diferente (Toso y Skliar, 2000). De acuerdo a su localización y características las úlceras se clasifican en cuatro tipos (Camacho, 2014):

- ❖ **Tipo 1 o de Johnson:** Es la más frecuente, se asocia con baja producción de ácido. Se localiza en la incisura angular en la curvatura menor, cercana al borde entre antro y cuerpo estomacal.
- ❖ **Tipo 2:** Es la presencia de una úlcera gástrica y una duodenal. Se asocia a hipersecreción ácida.
- ❖ **Tipo 3:** Es una úlcera prepilórica con hipersecreción ácida.
- ❖ **Tipo 4:** Ocurre cerca de la unión gastroesofágica.

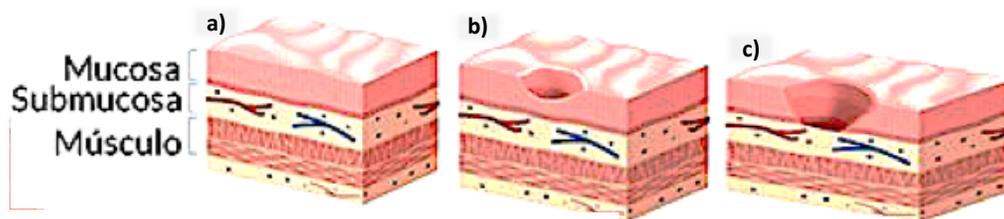


Figura 9. Capas del estómago afectadas por una úlcera péptica: a) normal, b) erosión y c) úlcera. Tomada de: <https://www.google.com.mx/search?q=capas+del+estómago+afectadas+por+una+úlcera+péptica>

Los factores de defensa clave de la mucosa gástrica incluyen la secreción de bicarbonato y prostaglandina, niveles elevados de antioxidantes y el mantenimiento

de niveles adecuados de NO, el cual dilata los vasos sanguíneos, aumenta el flujo sanguíneo y estimula la angiogénesis gástrica en el proceso de curación de las úlceras. El NO también estimula la proliferación celular de la mucosa gástrica y la formación de tejido de granulación en la base de una úlcera (Amaral *et al.*, 2013).

1.6.1.1 Fármacos usados en la terapéutica de problemas gástricos

Dentro de los grupos terapéuticos de los supresores de la hipersecreción gástrica y/o de los antiulcerosos, existen fármacos que actúan como antiseoretos de ácidos (omeprazol, esoprazol, rabeprazol, lanzoprazol y pantoprazol) que son inhibidores de la bomba de protones; también están los antagonistas del receptor H₂ (ranitidina, famotidina, nizatidina, cimetidina) (Tabla 3) y los protectores de la mucosa (bismuto, misoprostol y antiácidos) los cuales buscan cicatrizar las heridas (Molero *et al.*, 1997; Alva *et al.*, 2015). Los antagonistas de los receptores H₂ de la histamina son sustancias obtenidas a través de modificaciones de la molécula de la histamina partiendo de la observación de que un compuesto pueda competir con la histamina, que compiten con la histamina, reconocen el receptor y al unirse a él con mayor afinidad que la histamina inhiben los efectos histamínicos. En la actualidad existen cinco tipos de antihistamínicos disponibles para el tratamiento de la patología ulcerosa: cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina y roxatidina (Figura 10a) (Tabla 3) (Tomás, 2002).

Tabla 3. Propiedades farmacocinéticas de los fármacos antiseoretos H₂.

Fármaco	Biodisponi- bilidad	Fijación a proteínas plasmáticas	Vía media de eliminación (h)	Eliminación (Orina)
Cimetidina	70-76%	15-20%	2	48-75%
Ranitidina	50%	15%	2-3	70%
Famotidina	40-50%	15-20%	2, 5-4	90%
Nizatidina	90%	30-35%	1-2	90%
Roxatidina	80-90%	5-7%	6	60%

Adaptado de Tomás, 2002

Estos agentes se ligan de forma selectiva y reversible a los receptores H₂ de la histamina de la célula parietal, inhibiendo la actividad de la adenilciclasa y, por consiguiente, la producción intracelular de AMP cíclico, así como la potente acción secretora de ácido de la histamina. Debido a la participación de la histamina en el efecto estimulador de la gastrina y de la acetilcolina, los antagonistas de los receptores H₂ de la histamina inhiben también parcialmente la secreción ácida estimulada por estos secretagogos (Tomás, 2002).

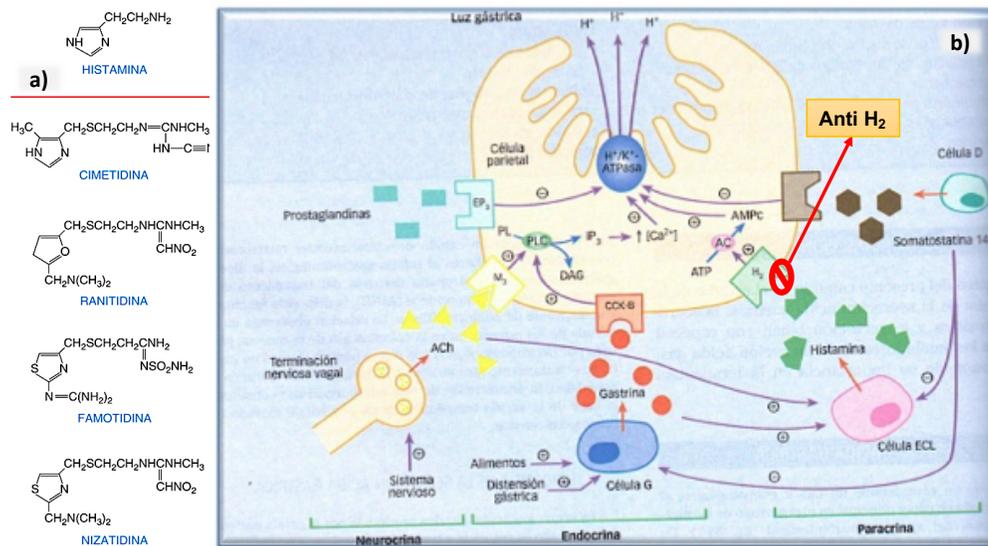


Figura 10. Fármacos antsecretores H₂: a) estructura química y b) mecanismo de acción. Tomado de: <https://www.google.com.mx/search?q=estructura+quimica+de+los+diferentes+antsecretores>

Se ha investigado ampliamente la seguridad de estos fármacos, los cuales, en general, son muy bien tolerados. Los síntomas gastrointestinales, en particular la diarrea (1.0%), las náuseas y los vómitos (0.8%), son las reacciones adversas más frecuentes (Tomás, 2002).

También están bien demostradas las manifestaciones del sistema nervioso central, que incluyen confusión mental, mareos y cefalea. La edad avanzada y la insuficiencia renal o hepática pueden aumentar su incidencia. Otras reacciones infrecuentes incluyen nefritis intersticial, fiebre, trombopenia, anemia, leucopenia e hipertransaminasemia leve y asintomática. Estas manifestaciones son reversibles tras la supresión del medicamento (Tomás, 2002).

La prevención o cura de las úlceras pépticas es uno de los desafíos más importantes que enfrenta la medicina hoy en día (Boligon *et al.*, 2014). La terapia para la úlcera gástrica enfrenta un gran inconveniente porque la mayoría de los medicamentos disponibles actualmente en el mercado muestran una eficacia limitada contra las enfermedades gástricas y a menudo se asocian con efectos secundarios graves y de acceso limitado debido a su costo. El control de la formación de especies reactivas y la secreción de ácido gástrico son esenciales para el tratamiento de estas patologías. Para este fin, las plantas medicinales que contienen una amplia variedad de antioxidantes, como los ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, taninos y terpenoides, son algunas de las fuentes más atractivas de nuevos medicamentos y se ha demostrado que producen resultados prometedores en el tratamiento de las úlceras gástricas (Arroyo *et al.*, 2013; Boligon *et al.*, 2014). En este contexto, es necesario promover investigaciones que busquen obtener un fitofármaco hecho de materia prima vegetal y con la menor cantidad de efectos adversos.

1.6.1.2 Modelos farmacológicos de evaluación gastroprotectora

Existen diferentes modelos experimentales de inducción de úlcera gástrica. Utilizando animales en dichos modelos, los investigadores simulan condiciones a las que los humanos pueden estar expuestos y, como resultado, desarrollan úlceras gástricas (Saini *et al.*, 2012; Amaral *et al.*, 2013; Boligon *et al.*, 2014). En las úlceras gástricas agudas, estos modelos animales se usan para estudiar la patogénesis de la ulceración y para examinar los agentes antiulcerosos que actúan principalmente inhibiendo la secreción de ácido gástrico (Tabla 4) (Lu *et al.*, 2014).

En las lesiones agudas de la mucosa gástrica que se desarrollan rápidamente con erosiones hemorrágicas múltiples, las lesiones generalmente son inducidas por la administración intragástrica de productos químicos, como etanol concentrado, NaOH, ácido acético y HCl que inducen lesiones de la mucosa en ratas en ayunas sin un papel obvio para la presencia de HCl gástrico endógeno. Estos modelos se han utilizado ampliamente para probar algunos agentes citoprotectores y estudiar el

papel de los prostanoideos endógenos en la patogenia de las lesiones gástricas (Lu *et al.*, 2014).

Tabla 4. Modelos animales de erosiones, úlceras gástricas y duodenal.

Agente dañino	Tipo de animal	Tipo de lesión	Relevancia para los humanos
Etanol (50-100%)	Rata	Gástrico, agudo	Si
Aspirina	Rata o ratón	Gástrico, agudo	Si
Indometacina	Rata o hamster	Gástrico, agudo, crónico	Si
Estrés	Rata	Gástrico, agudo, crónico	Si
NaOH	Rata	Gástrico, agudo	No
HCl	Rata	Gástrico, agudo	Si
Ácido acético	Rata o gato	Gástrico, crónico	No

Tomada y adaptada de Lu *et al.*, 2014.

Algunos de estos químicos son relevantes para los humanos, como el consumo de alcohol y la producción excesiva de HCl en el estómago. Otra forma de erosión hemorrágica aguda es inducida por el estrés físico o biológico. El estrés en sí mismo es la respuesta no específica del cuerpo a cualquier demanda del ambiente. Es una vía neuroendocrina común (no específica) donde una de las manifestaciones morfológicas es la úlcera gástrica (Lu *et al.*, 2014).

Tanto la aspirina como la indometacina son medicamentos AINEs más antiguos y los más utilizados. Es probable que la patogénesis sea causada por el agotamiento de las prostaglandinas en la mucosa gástrica y la naturaleza ácida de los fármacos que causan daño directo en el epitelio gástrico. Las úlceras son inducidas por una dosis oral única de aspirina o indometacina nuevamente en ratas en ayunas exclusivamente en el estómago. Las inyecciones subcutáneas diarias de indometacina en ratas pueden inducir múltiples úlceras en el yeyuno y el íleon. En el hámster, grandes dosis de inyección subcutánea de indometacina diariamente

durante cinco días inducen úlceras antral o prepilóricas agudas y subagudas únicas (Lu *et al.*, 2014).

La inducción de úlceras gástricas mediante el empleo de etanol consiste en la administración de 1.0 mL de etanol que conduce a la ulceración a través de la penetración en la mucosa gástrica. Se ha documentado que el etanol aumenta la permeabilidad vascular y provoca la liberación de productos vasoactivos. Además, el etanol causa daños severos a la mucosa gastrointestinal con lesiones microvasculares que aumentan la permeabilidad vascular y disminuye la secreción del ion bicarbonato (HCO_3)¹⁻ y el daño del moco. Diversas evidencias indican que durante la ulceración inducida por etanol hay un aumento de la infiltración de neutrófilos en la mucosa gástrica que resulta en un aumento del estrés oxidativo con una mayor generación de radicales libres, siendo los principales sellos distintivos en la patogénesis de la ulceración. El etanol activa TNF- α y proteínas quinasas activadas por MAPK e inicia la apoptosis que conduce a la muerte celular. La muerte celular es la principal responsable de la progresión de las úlceras. El etanol adicional genera el ROS que conduce a la inducción de las úlceras (Saini *et al.*, 2012).

El etanol se considera un factor de riesgo para desarrollar úlceras gástricas. Penetra fácilmente la mucosa gástrica debido a su capacidad para solubilizar la mucosa protectora y exponer la mucosa a las acciones proteolíticas e hidrolíticas del ácido clorhídrico y la pepsina, causando daño a la membrana. Además, el alcohol estimula la secreción de ácido y reduce el flujo sanguíneo que conduce a lesiones microvasculares, a través de la interrupción del endotelio vascular y facilitando la permeabilidad vascular. También aumenta la actividad de la xantina oxidasa. El etanol también desencadena desequilibrios en los procesos antioxidantes celulares (Buenor *et al.*, 2013).

Por ejemplo, provoca la liberación de anión superóxido y radicales libres de hidroperóxidos y, por lo tanto, aumenta el estrés oxidativo en los tejidos, evidenciado por mayores niveles de malondialdehído, un marcador de aumento de la peroxidación lipídica. Los efectos nocivos del etanol se manifiestan ya sea a través de la generación directa de metabolitos reactivos, incluidas las especies de

radicales libres que reaccionan con la mayoría de los componentes celulares, cambiando sus estructuras y funciones, o contribuyendo a otros mecanismos que finalmente apoyan el daño oxidativo. El etanol también produce lesiones necróticas en la mucosa gástrica de los animales por un efecto tóxico directo, reduciendo así la secreción de bicarbonatos y agotando la producción de moco gástrico en los animales (Buenor *et al.*, 2013).

Además, el daño de la membrana inducido por etanol está asociado con una mayor permeabilidad de la membrana plasmática por el sodio y el agua. También produce una acumulación masiva intracelular de calcio, que representa un paso importante en la patogénesis de la lesión de la mucosa gástrica. Esto conduce a la muerte celular y la exfoliación en el epitelio de la superficie. Además, la ulceración inducida por etanol está relacionada con la reducción de la microcirculación de la mucosa y con un aumento de la apoptosis (Buenor *et al.*, 2013).

Los efectos dañinos del etanol se han explotado en el desarrollo del modelo de etanol de úlceras pépticas. El modelo es independiente de la secreción de ácido gástrico y se parece a las úlceras pépticas agudas en humanos. Como modelo, la úlcera inducida por etanol puede no ser apropiada o útil para la evaluación de la utilidad de los fármacos antiseoretos o los materiales de prueba debido a la ausencia de secreción de ácido gástrico donde la secreción de ácido subyace al desarrollo de la úlcera. En cambio, el modelo de úlcera inducida por etanol es útil para estudiar la eficacia de posibles fármacos o agentes de prueba que tienen actividades citoprotectoras y/o antioxidantes (Buenor *et al.*, 2013).

Para inducir úlceras con etanol, los animales están en ayunas durante 24 a 36 horas, después de lo cual se administra etanol al 96% o absoluto (100%) en una dosis de 1.0 mL/200 g de peso corporal a cada animal y después de 1 hora se sacrifica a los animales. Se recomienda que, para cada estudio, se realice una evaluación preliminar para determinar la dosis efectiva requerida para la inducción óptima de úlceras (Buenor *et al.*, 2013).

2. Planteamiento del problema

Las brácteas y flores de *T. americana* var. *mexicana* son utilizadas y comercializadas ampliamente por la población mexicana para tratar el insomnio. Además la, madera de esta especie vegetal se utiliza en la elaboración de productos artesanales que se comercializan. En consecuencia, se ha provocado que de dicha especie vegetal sea talada de manera ilegal y catalogada en peligro de extinción por la SEMARNAT. Adicional a esta problemática, la formación de nuevos individuos por vía sexual es mínima debido a la latencia de las semillas (endógena y exógena), provocando con ello que el número de poblaciones en su ambiente natural disminuya. Por tal motivo, es importante implementar técnicas que permitan la regeneración y multiplicación de esta especie vegetal, para asegurar su conservación; así como la obtención de compuestos activos a través de cultivos *in vitro*.

Por otro lado, considerando que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos utilizados para tratar el dolor, la inflamación aguda-crónica y la fiebre provocan efectos secundarios como esofagitis, úlceras (hemorragia, erosiones y perforación) y gastroduodenitis; y los fármacos antiulcerosos para el alivio de los síntomas y la cicatrización, frecuentemente provocan diarrea, náuseas y vómitos, existe una gran necesidad de descubrir o desarrollar nuevos agentes antiinflamatorios y antiulcerosos más seguros y eficaces. En este sentido, el uso de plantas medicinales o de sus componentes activos representa una alternativa cada vez más explorada y promisoría para el tratamiento de estos desórdenes. Sin embargo, la limitada evidencia científica con respecto a la eficacia de estos derivados naturales, conjuntamente con la poca comprensión de sus mecanismos de acción involucrados, ha limitado su incorporación a la práctica clínica. La infusión de hojas de *T. americana* var. *mexicana* también es empleada como antiespasmódico, para el tratamiento de la enterocolitis, gastroenteritis, así como para cólicos hepáticos renales y de la vejiga.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿El empleo de diferentes tipos y concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal podrán inducir la formación de brotes múltiples y tejidos desdiferenciados utilizando como explantes yemas apicales y axilares de *T. americana* var. *mexicana* en el medio de cultivo Murashige and Skoog gelificado?

¿Las hojas de la planta silvestre y los tejidos desdiferenciados de *T. americana* var. *mexicana* serán capaces de producir compuestos con actividad gastroprotectora y antiinflamatoria?

3. Justificación

Diversos estudios científicos sustentan la efectividad ansiolítica, sedante y antidepresiva de los extractos de inflorescencias, brácteas y hojas de *Tilia americana* var. *mexicana* atribuida a los compuestos glicosilados derivados de los flavonoides camferol y quercetina como el tilirósido y 3- β -*D*-glucósido de quercetina. Estos antecedentes integran la plataforma científica que sustenta las potencialidades de la especie para el desarrollo de un fitofármaco. También se reporta el uso medicinal de esta especie para aliviar padecimientos y síntomas asociados a la inflamación y gastrointestinales, se ha demostrado que la infusión de inflorescencias posee actividad analgésica.

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 permita obtener material vegetal. La biotecnología vegetal es una alternativa factible que permite obtener plantas y tejidos desdiferenciados de manera controlada y de calidad. Por lo tanto, el desarrollo de este trabajo de investigación aborda el establecimiento de cultivos *in vitro* de brotes múltiples y tejidos desdiferenciados de *T. americana* var. *mexicana*, al evaluar el efecto de combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal en explantes de yemas apicales y axilares; así como determinar su potencial de sintetizar los compuestos activos ya identificados y corroborar su uso en la medicina tradicional a través de la evaluación de los extractos metanólicos en modelos murinos de inflamación y ulceración agudos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Valorar el efecto antiinflamatorio y gastroprotector del extracto metanólico de hojas de la planta silvestre y tejidos desdiferenciados de *T. americana* var. *mexicana* en modelos murinos.

4.2. Objetivos particulares

- ❖ Determinar las combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal óptimas para la generación de brotes múltiples y tejido desdiferenciado en yemas apicales y axilares de *T. americana* var. *mexicana* en medio de cultivo de Murashige y Skoog gelificado.
- ❖ Determinar el perfil químico del extracto metanólico de hojas de la planta silvestre y tejidos desdiferenciados de *T. americana* var. *mexicana* en medio MS gelificado, mediante el uso de estándares y el empleo de las técnicas de CCF y HPLC.
- ❖ Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos de hojas de la planta silvestre y tejidos desdiferenciados de *T. americana* var. *mexicana* en el modelo de edema auticular inducido con TPA.
- ❖ Evaluar la actividad gastroprotectora de los extractos metanólicos de hojas de la planta silvestre y tejidos desdiferenciados de *T. americana* var. *mexicana* en el modelo de úlceras gástricas inducidas con etanol.

5. Hipótesis

Las yemas axilares y apicales de *T. americana* var. *mexicana* podrían tener el potencial de generar múltiples brotes y/o tejidos desdiferenciados en respuesta al estímulo de 6-bencilaminopurina y tidiazurón.

El uso tradicional de *T. americana* var. *mexicana* para tratar padecimientos gastrointestinales, confieren que los extractos metanólicos de hojas de planta silvestre poseen compuestos con actividad antiinflamatoria y/o gastroprotectora.

6. Materiales y métodos

6.1 Colecta del material vegetal

Se realizaron colectas de ramas de árboles de *T. americana* var. *mexicana* ubicados en el poblado de Mexicapan, Estado de México (18°59'20.22" N, 99°19'11.04" O, 2205 msnm, 18°59'28.05" N, 99°19'26.16" O) a 2327 msnm, durante los meses de Septiembre, Marzo y Junio en los años 2015 a 2019. Se depositó un ejemplar en el herbario de plantas medicinales en la Ciudad de México, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM), para la identificación de los especímenes por la responsable del herbario, la M en C Abigail Aguilar Contreras, quien le asignó el código número IMSSM-5099.

Las ramas se trasladaron y depositaron en el invernadero del Centro de Investigación Biomédica del Sur (Xochitepec, Morelos). Se realizó la separación de las hojas libres de plagas de las ramas y se colocaron sobre una mesa de alambre de malla, se secaron a temperatura ambiente bajo una malla de semi sombra de 90% durante 3 días. Posteriormente, las hojas se molieron con ayuda de una licuadora (Oster) a un nivel de velocidad de 2, se depositaron en bolsas de plástico y se almacenaron a una temperatura de 25 ± 2 °C hasta su posterior utilización.

6.2 Propagación vegetativa

Las ramas se cortaron en segmentos con una longitud de 20 cm, seleccionando aquellos que tuvieran 1.5 cm de diámetro y de 3 a 4 nudos (Muñoz *et al.*, 2011). A los esquejes se les realizó un corte en forma horizontal en el extremo superior y otro en forma vertical en el extremo inferior (basal), procurando que estos cortes estuvieran a 1.0 cm de las yemas; posteriormente, los esquejes se sumergieron en agua por su extremo basal aplicando inmediatamente polvo enraizador comercial Radix 10000[®] que contiene 10,000 partes por millón de AIB. Se plantaron 30 esquejes por caja de plástico (60 x 40 x 20 cm) con drenado del agua repletas a tres cuartos de su capacidad con una mezcla del sustrato comercial Growing mix (Sunshine Fine mixture [70–80%] Canadian peat moss, vermiculite, ground lime

[chalk] and a moisturizing agent) y tierra de monte en una relación (2:1). Las cajas fueron colocadas en un invernadero bajo malla de semi sombra del 90% (Avilés, 2008). Los esquejes se regaron cada 4 a 7 días de acuerdo a las condiciones ambientales, con agua potable y cada 15 días se le agregó la solución nutritiva de las sales del medio de cultivo MS al 25% (Murashige y Skoog, 1962).

Los esquejes fueron sometidos a remoción manual y se tomaron como positivos (esquejes enraizados) a todos aquellos que presentaron resistencia a tal acción, la evaluación se realizó cada 15 días durante 2 meses. Para evitar la infección por hongos y/o la invasión de insectos, se aplicó por aspersion fungimicyn agricola 5% (QUINASA, México) en una relación (0.1:100, p/v) humedeciendo toda la planta, cada 20 días durante 4 meses, posteriormente, la fumigación se realizó 1 vez cada 3 meses.

Después de 7 meses de edad, se inició con el proceso de aclimatación de los esquejes que formaron raíces, para lo cual se transfirieron a macetas de plástico (27 x 32 cm), con el mismo sustrato y se mantuvieron en un invernadero de malla de semisonbra al 90%. Los esquejes continuaron desarrollándose y a la edad de 17 meses fueron transferidos a macetas de 55 x 86 cm y expuestos a condiciones medio ambientales en el jardin del CIBIS en Xochitepec, Morelos, México; en ambos casos el riego se realizó de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente.

6.3 Cultivos *in vitro*

6.3.1 Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo MS suplementado con: 100 mg/L de hidrolizado de caseína, 100 mg/L de glutamina (200 mM, Sigma-Aldrich), 30 g/L de sacarosa, 1.0 g/L de polivinilpolipirrolidona (PVPP, Sigma-Aldrich) y como agente gelificante 4.0 g/L de fitagel (Sigma-Aldrich). El pH se ajustó a 5.7 mediante el uso de soluciones con NaOH y HCl 1.0 N según fuera el caso. Los medios de cultivo se distribuyeron en frasco tarro de vidrio (40 mL) y se esterilizaron en autoclave a 121°C, a 1.5 kg/cm² de presión durante 18 min.

6.3.2 Cultivo aséptico

Después de 20 a 30 días de plantadas las estacas de *T. americana* var. *mexicana*, se seleccionaron brotes sanos con yemas apicales y múltiples yemas axilares, se cortaron y colocaron en un recipiente con solución antióxidante (medio de cultivo MS al 25% y 200 mg/L de cisteína) para su traslado a la campana de flujo laminar. Los brotes se transfirieron a una caja Petri conteniendo solución antioxidante y las yemas apicales y axilares se cortaron a una longitud de 0.5 cm. El proceso de desinfección de las yemas consistió en sumergir los explantes en Extrán® (MA 02, Merck) a diferentes concentraciones (0.5% o 1.0%) durante 2, 3 o 5 min; posteriormente, se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaOCl) comercial (Cloralex®) a las concentraciones de 0.35%, 0.5% y 0.7% durante 5, 10 o 15 min. Ambos procesos se realizaron con agitación manual y se enjuagaron por tres veces con agua destilada estéril (Borges *et al.*, 2009; Bogado *et al.*, 2016). Las yemas se sembraron en los medios de cultivo con los tratamientos fitohormonales propuestos para la inducción de brotes y/o callogénesis. El parámetro a evaluar en esta fase experimental fue: el número de explantes viables (explantes libres de microorganismos) cada semana por 30 días de cultivo.

Con el propósito de asegurar la asepsia de los cultivos *in vitro*, al inicio a los medios de cultivo se les adicionó en condiciones estériles, 5.0 mg/L amphotericina B (250 µg/mL, Sigma-Aldrich) y 50 mg/L de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) a través de filtración (Acrodisc, Pall, 0.2 µm) (Nicasio *et al.*, 2012). Los medios de cultivo se mantuvieron en un cuarto de cultivo a una temperatura de 25 ± 2°C.

6.3.3 Inducción de brotes y callos

Para la inducción de brotes y callos de *T. americana* var. *mexicana* se emplearon las citocininas BA a las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L en combinación con una concentración constante de ANA a 0.25 mg/L y/o TDZ a 0.005, 0.01 y 0.02 mg/L en combinación con AIB a 0.1 mg/L (Chalupa, 2003; Zurita *et al.*, 2014).

Cada tratamiento consistió de 10 yemas apicales y/o 10 yemas axilares, sembrando un explante por frasco tarro de vidrio en el medio de cultivo y tratamiento hormonal

indicado, 6 tratamientos por cada tipo de yema. Los frascos tarro se conservaron en un cuarto de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 60%, manteniendo un fotoperiodo de 16 h luz (intensidad luminosa de $32 \mu\text{mol}/\text{seg}\cdot\text{m}^2$) por 8 h de oscuridad. Los tejidos fueron cambiados a frascos con medio de cultivo nuevo cada 4 semanas, evaluando los indicadores en cada tratamiento: número de explantes que responden al tratamiento hormonal, número de explantes que forman callo, número de explantes que forman brotes y número de brotes por explante, número de hojas por brote y sus características a los 30, 60 y 90 días de cultivo. Los resultados obtenidos fueron comparados mediante un análisis de varianza (ANOVA) factorial de 2 componentes (A x B, concentración y tipo de hormona) seguido de una post-prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%, empleando el software SAS System for Windows 9.0, (SAS, ver. 9.1; SAS Institute, Inc.).

6.3.4 Instalación de los sistemas de inmersión temporal tipo RITA®

Se emplearon sistemas de inmersión temporal (SIT) tipo RITA® (Sigma-Aldrich) de 500 mL de capacidad. Se ensamblaron los componentes internos de acuerdo al manual del proveedor; posteriormente, se colocaron en las salidas de aire (R03 Cap) tubos de silicona de 10 mm de diámetro (R16 Vent tubings), la esterilidad del aire suministrado través de bombas de aire (Elite 800) se proporcionó mediante el empleo de filtros de 37 mm de diámetro ($0.1 \mu\text{m}$, R10 Air vent); en la parte superior del filtro se conectaron magueras de silicona autoclavable de 8 mm de diámetro (Masterflex® 96410-16).

La frecuencia y tiempo de inmersión del sistema RITA® se controló con un temporizador de uso rudo de 2 canales (Steren, Temp-310), la programación del equipo se realizó como se indica a continuación:

- a) Para la programación del equipo, se eligió la opción de normalmente abierto, ya que esta opción permite encender y apagar el equipo a las condiciones programadas.

- b) El canal 1 se utilizó para controlar un sistema RITA, la energía eléctrica de la bomba de aire se introdujo en la entrada 1 del timer y el cable de alimentación del sistema RITA se instaló en la entrada 2. En el canal 2, se implementó un segundo sistema RITA, utilizando las entradas 4 y 5 bajo las mismas condiciones de instalación.
- c) El cable negativo del dispositivo a controlar (sistema RITA) se conectó junto con el cable instalado en la línea N.
- d) Para programar el dispositivo se eligió la opción modo automático.

Los sistemas de inmersión RITA[®] se mantuvieron en el cuarto de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de 60% y fotoperiodo de 16 h luz (intensidad luminosa de $32 \mu\text{mol}/\text{seg} \cdot \text{m}^2$) por 8 h de oscuridad.

6.3.5 Inducción de brotes mediante el sistema RITA[®]

Para los ensayos en el RITA[®] se emplearon explantes de yemas apicales y axilares obtenidos de los esquejes y desinfectados bajo las mismas condiciones ya descritas anteriormente. Se empleó medio de cultivo MS líquido complementado con 30 g/L de sacarosa y los tratamientos hormonales obtenidos para la inducción de brotación en medio MS gelificado, 2.0 mg/L de BA en combinación de 0.25 mg/L de ANA para yemas apicales y 0.5 mg/L de BA en combinación de 0.25 mg/L de ANA para yemas axilares. A cada recipiente RITA se le agregó 130 mL del medio de cultivo y se les colocaron 20 explantes de yemas apicales y/o axilares, según corresponda sobre la base filtro. La frecuencia de inmersión establecida fue de 8 h, durante 3.0 min para las yemas apicales y 1.0 min en las yemas axilares. Se evaluó el número de brotes y/o de tejido desdiferenciado por explante.

6.4 Análisis Químico

6.4.1 Obtención de extractos

Se cosecharon callos generados de yemas apicales cultivadas en medio MS con 0.005 mg/L de TDZ y 0.1 mg/L de AIB, y de explantes de hojas en medio MS con 1.0 mg/L de 2,4-D y 0.5 mg/L de CN previamente obtenidos. Por separado, los

tejidos se colocaron sobre un papel filtro Watman No. 4 en un embudo de porcelana y se lavaron con agua destilada para eliminar los residuos de medio de cultivo aplicando vacío a través de un Matraz kitasato.

Hojas y biomasa de callos secas y pulverizadas (1.0 g) se extrajeron independientemente por maceración a temperatura ambiente con metanol grado reactivo (Merck) en una proporción 1:20 (p/v) durante 24 h, repitiéndose el proceso tres veces. Los extractos obtenidos fueron filtrados con ayuda de un papel filtro Watman No.1, los extractos de cada tejido se reunieron y se concentraron a presión reducida con un rotavapor (BUCHI R-124) y el residuo obtenido se pesó.

6.4.2 Análisis de escopoletina, 3-β-D-glucósido de quercetina y tilirósido

Los extractos metanólicos de hojas del árbol silvestre y de las biomásas de callo se analizaron por HPLC para la cuantificación de los compuestos activos escopoletina (99%, Sigma-Aldrich), 3-β-D-glucósido de quercetina (90%, Sigma-Aldrich) y el tilirósido (98%, Sigma-Aldrich). Para ello, se construyeron curvas de calibración utilizando soluciones estándar a las concentraciones de 2.5 a 40 μg/mL con los estándares de los compuestos a cuantificar. Se utilizó un modelo de regresión lineal ($y = mx + b$) y coeficientes de correlación $R^2 \geq 0.9965$ utilizando el software Microsoft Excel 2010 (Pérez *et al.*, 2014, Nicasio *et al.*, 2016). Los contenidos de los compuestos en cada extracto metanólico fueron comparados mediante un ANOVA simple seguido de una *post*-prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$) utilizando el software SAS System for Windows 9.0, (SAS, ver. 9.1; SAS Institute, Inc.).

6.4.3 Condiciones de HPLC

Para los análisis de HPLC se empleó un equipo Water 996 con bombas binarias (2695), acoplado a un detector de arreglo de diodos (2996) con un rango de detección de 190 a 600 nm, operado por el software Millenium System Manager (Empower 1). La separación se llevó a cabo utilizando una columna Spherisorb ODS-2 (250 x 4.6 mm, 5 μm, Waters), a una temperatura constante de 25 °C durante

el análisis. Las muestras se inyectaron a una concentración de 10 mg/mL (20 μ L), mediante un flujo constante de 1.0 mL/min de un sistema de elución por gradientes agua acidificada al 0.5% de ácido trifluoroacético (TFA, 99%, Sigma-Aldrich) y acetonitrilo: la fase móvil inició con agua al 100% manteniéndola por 1.0 min; posteriormente, la proporción de acetonitrilo se incrementó al 5% en 2.0 min y se mantuvo por 1 min; al 30% en 1.0 min y se mantuvo por 11 min; al 50% en 1.0 min y se mantuvo por 2.0 min; al 80% en 1.0 min y al 100% por 1.0 min. El sistema regresó a las condiciones iniciales de la fase móvil en 1.0 min y se mantuvo durante 3.0 min para poder iniciar otro análisis. El tiempo total de elución empleado fue de 25 min (Pérez *et al.*, 2014, Nicasio *et al.*, 2016).

Se analizó la presencia de los compuestos escopoletina (99%, Sigma-Aldrich), 3- β -D-glucósido de quercetina (90%, Sigma-Aldrich) y tilirósido (98%, Sigma-Aldrich), con base a sus espectros de absorción y tiempos de retención (tr): escopoletina (λ = 343 nm, tr = 11.15 min), 3- β -D-glucósido de quercetina (λ = 355 nm, tr = 9.22 min) y el tilirósido (λ = 314 nm, tr = 17.22 min).

6.4.4 Fraccionamiento del extracto metanólico de biomasa de callo

El extracto metanólico, a partir de biomasa de callo derivados de yemas, se obtuvo bajo las mismas condiciones de extracción ya descritas anteriormente; (20.91 g, 20.70% de rendimiento). Posteriormente, el extracto se fraccionó en columna cromatográfica abierta (70 x 5.5 cm) empacada con silica gel 60 (0.2-0.5 μ m, Merck, México), empleando un sistema de gradientes de diclorometano:metanol (Tabla 5). Se colectaron alícuotas de 150 mL y las cuales se concentraron con un rotavapor (BUCHI R-124).

Las fracciones 41 a la 138 se analizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF, Silica gel 60, F₂₅₄, Merck) y el sistema diclorometano:metanol en una relación (8:2, v/v). Para la detección de flavonoides, las placas cromatográficas se revelaron con 2-aminoacetil difenilborinato (1% en etanol) y calor (100 °C) durante 5 s, y se observaron en una cámara de UV a una λ = 366 nm.

Las alícuotas con base a su análisis del perfil cromatográfico similar en CCF se reunieron en 29 fracciones y de acuerdo con sus características químicas se seleccionaron 6 fracciones para su análisis en HPLC.

Tabla 5. Condiciones del sistema de elución del fraccionamiento del extracto metanólico de biomasa de callo de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Sistema	% Proporción
Diclometano	100
	95:5
	90:10
Diclorometano:Metanol	85:15
	80:20
	70:30
Metanol	100

6.4.5 Análisis de HPLC del fraccionamiento del extracto metanólico de biomasa de callo

Se seleccionaron las fracciones F6, F11, F15, F23, F24 y F27, ya que en ellas se tenían una mezcla compleja de cumarinas y/o flavonoides, para su evaluación en los modelos de edema auricular inducido con TPA y el de úlcera gástrica inducida con etanol. Las fracciones fueron analizadas por HPLC, la separación se llevó a cabo utilizando una columna Supelco Discovery® C18 (25 x 4.6 mm, 5.0 µm, Waters), a una temperatura constante de 25°C durante el análisis. Las muestras se inyectaron a una concentración de 2.0 mg/mL, mediante un flujo constante de 0.9 mL/min, empleando un sistema de elución por gradientes de TFA al 0.05% de ácido trifluoroacético y acetonitrilo. La fase móvil inicio con TFA (0.5%) al 100% manteniéndola por 1.0 min; posteriormente, la proporción de acetonitrilo se incrementó al 5% en 2.0 min y se mantuvo por 1 min; al 30% en 1.0 min y se mantuvo por 16 min; al 50% en 1.0 min y se mantuvo por 2.0 min; al 80% en 1.0 min y se mantuvo por 1.0 min y al 100% por 1.0 min. El sistema regresó a las condiciones

iniciales de la fase móvil en 1.0 min y se mantuvo durante 2.0 min para poder iniciar otro análisis. El tiempo total de elución empleado fue de 30 min. Los tiempos de retención y su correspondiente espectro de absorción fueron comparados con los obtenidos para los estándares comerciales (Sigma-Aldrich) de cumarinas (escopoletina, esculina y esculetina) y flavonoides (3-β-D-glucósido de quercetina, rutina, hesperidina, tilirósido y canferol). El análisis de los cromatogramas permitió la selección de las fracciones en contenido se observó la presencia de cumarinas y/o flavonoides (F6, F15 y F23).

6.5. Evaluación biológica

6.5.1 Animales

Se utilizaron ratones hembra de la cepa ICR de 20-25 g, conservados bajo condiciones de bioterio a temperatura de 22 ± 3 °C, humedad de $70 \pm 5\%$ con ciclos de 12 h luz/oscuridad, con libre acceso a la comida y agua. Los ratones se adaptaron durante tres semanas al entorno del bioterio antes de iniciar los experimentos. El protocolo se autorizó por la Comisión de Ética en Salud con el número de registro R-2016-1702-4. Todas las manipulaciones se realizaron de acuerdo a los procedimientos indicados en la norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio).

6.5.2 Edema auricular inducido con TPA

La actividad anti-inflamatoria de los extractos metanólicos de hojas, callos y las fracciones (F6, F15 y F23) se evaluó en el modelo de edema auricular inducido con TPA (99%, Sigma-Aldrich) a una dosis de 2.5 µg/oreja, disuelto en 20 µL de acetona (Patel y Gowda, 2012). Cada grupo experimental estuvo formado por 6 ratones. El extracto metanólico de hojas del árbol silvestre se evaluó a las dosis 0.125, 0.25, 0.50 y 0.75 mg/oreja, el extracto metanólico de callo proveniente de yemas apicales se evaluó a las dosis de 1.0, 1.5, 1.75 y 2.0 mg/oreja y las fracciones (F6, F15 y F23) se evaluarán a 1.0 mg/oreja disueltos en 20 µL de metanol. Como control

positivo se utilizó indometacina a una dosis de 0.50 mg/oreja (99%, Sigma-Aldrich) disuelta en 20 μL de acetona. Los tratamientos y la indometacina se administraron tópicamente con 10 μL en la superficie interna y 10 μL en la externa de las orejas derecha de los ratones, inmediatamente después de la aplicación del TPA. Las orejas izquierda de los ratones fueron tratadas de la misma forma con acetona (control negativo). Cuatro horas después de la administración del TPA, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se cortaron secciones de 6 mm de diámetro de las orejas tratadas y no tratadas. El porcentaje de inhibición se determinó por diferencias de peso de la oreja tratada (derecha) y la no tratada (izquierda) mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\left(\frac{\text{Control} - \text{Tratamiento}}{\text{Control}} \right) * 100 \right]$$

Los resultados obtenidos en cada experimento fueron comparados por un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una *post*-prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%, ($p \leq 0.05$) con el software SAS System for Windows 9.0 (SAS, ver. 9.1; SAS Institute, Inc.).

Se construyeron curvas dosis *versus* inhibición del edema auricular de los extractos metanólicos de las hojas y los callos, mediante un modelo de regresión lineal ($y = mx+b$), utilizando el software Microsoft Office Excel 2010 a través de la cual se determinó la dosis efectiva media (DE_{50}) para cada extracto.

6.6 Úlceras gástricas inducidas con etanol

La evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos metanólicos de hojas, callos y las fracciones (F6, F15 y F23), se realizó en el modelo de úlceras gástricas inducidas con etanol (Armita *et al.*, 2012; Buenor *et al.*, 2013). Se utilizaron ratones hembras de la cepa ICR de 40-42 g. Cada grupo experimental estuvo formado por 6 ratones. Los ratones se separaron en cajas individuales, las cuales contenían en su interior una malla de alambre para evitar que se alimentarán del

aserrín, permaneciendo en ayuno durante 24 h. Los extractos metanólicos de hojas y callos de *T. americana* var. *mexicana* se administraron por vía oral a una dosis de 100 mg/kg, las fracciones se administraron a una dosis de 10 mg/kg, como control positivo se utilizó la famotidina a 20 mg/kg y como control negativo Tween 20 al 1.0%. Una hora después de administrados los tratamientos, a los ratones se les administró vía oral etanol absoluto (Merck) a una dosis de 350 μ L/kg. Después de 1 h de administrado el etanol, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Mediante laparotomía se extrajeron los estómagos, los cuales fueron abiertos por la curvatura mayor, se lavaron con abundante agua para eliminar el contenido gástrico y se colocaron sobre un acetato (5 x 5 cm).

6.6.1 Determinación del área ulcerada

Las imágenes de los estómagos evaluados con los tratamientos respectivos y los controles se capturaron mediante una cámara fotográfica (CANON, EOS 70D) con un zoom de 50x y sin flash, en una caja oscura y manteniendo la distancia entre el lente de la cámara y la base de la caja de 10 cm. Todas las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el programa ImagenJ, a través del siguiente procedimiento:

- a) En el programa ImagenJ aumentar el zoom de la imagen con ayuda de la lupa (*Magnifying glass*) hasta un 50-75%, esto permite la observación más amplia del estómago y un mejor delineado de las áreas a trabajar.
- b) Para establecer la escala (*Set escale*) con la que se trabajó, primeramente, con una regla se determinó la longitud del estómago, y posteriormente, con el ícono de líneas y flechas a mano alzada (*Segmented or freehand lines*) se dibujó una línea para indicar la longitud del estómago (colocándola de la misma forma en que se midió con la regla). En el menú de analizar (*Analyse*), seleccionar la opción *Set escale*, escribir la longitud del estómago (*Know distance*) y en unidades de longitud (*Unit of length*) se escribió la abreviatura cm, para finalizar y establecer las condiciones.

- c) Para calcular el área total del estómago, se dio click en el ícono de selección a mano alzada (*Freehand selections*) y se delimitó todo el contorno del estómago.
- d) En el menú analizar se eligió la opción de medida (*Measure*) y automáticamente el programa despliega una nueva ventana con el cálculo del área total del estómago.
- e) Para determinar el área ulcerada, se repitieron los pasos indicados en los incisos c y d, en este punto solo se seleccionaron de forma independiente las áreas con formación de úlceras (todas aquellas áreas que presentarán una coloración roja y/o negra).

Con los resultados de las áreas ulceradas se determinó el % de ulceración del estómago:

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

El porcentaje de protección se determinó por diferencias de áreas de los estómagos mediante la siguiente ecuación:

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

Los resultados obtenidos en cada experimento fueron comparados por un ANOVA, seguido de una *post*-prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$) con el software SAS System for Windows 9.0 (SAS, ver. 9.1; SAS Institute, Inc.)

7. Resultados y discusiones

7.1 Obtención de plantas de *Tilia americana* var. *mexicana* a partir de esquejes

Los esquejes de *T. americana* var. *mexicana* sirvieron como plantas madre, debido que son estructuras vegetativas que brindaron la generación de brotes, utilizándose como fuentes para la obtención de yemas apicales y yemas axilares.

El 60% de los esquejes viables de *T. americana* var. *mexicana* generaron el desarrollo de brotes a los 8 días de cultivo, los cuales presentaron sus primeras hojas de aproximadamente 1 cm de longitud, una coloración rosada en el haz y verde en el envés. A los 25 días de cultivo los brotes adquirieron una coloración verde y desarrollando un gran número de yemas apicales y axilares (Figura 11 a-b). A los 15 días de cultivo, el 40% de los esquejes de *T. americana* var. *mexicana* se secaron paulatinamente y no formaron raíces.

La aplicación del enraizador comercial Radix 10,000[®] ppm de AIB estimuló la formación de raíces en el 3.12% de los esquejes viables. Las plantas de *T. americana* var. *mexicana* se transfirieron a macetas individuales con el sustrato y bajo las condiciones descritas anteriormente, lo que permitió su crecimiento y el desarrollo de nuevas hojas de color verde, en promedio las plantas alcanzaron una altura de 15-20 cm (Figura 11c), las plantas se mantuvieron durante siete meses en condiciones de invernadero. Posteriormente, a los 17 meses de edad, las plantas se transfirieron a condiciones medioambientales, en esta etapa las plantas continuaron desarrollándose con la aparición de nuevos brotes y yemas, hojas verdes de aproximadamente 20 cm de longitud, con una altura promedio de 1.0 m y con la formación de 3-5 ramas por esqueje (Figura 11d). Es el primer trabajo en el que se reporta la obtención de plantas completas de *T. americana* var. *mexicana* obtenidas por esquejes.

La propagación de plantas mediante esquejes, permite la obtención de plantas de calidad, uniformidad, resistentes o tolerantes a plagas y enfermedades, con mejores características morfológicas y fisiológicas. Sin embargo, este procedimiento es difícil de realizarlo en especies leñosas porque su capacidad de enraizamiento disminuye con la edad de la planta. Se ha demostrado que las estacas provenientes de las partes más bajas del árbol enraizan mejor y presentan un crecimiento más

adecuado que aquellas obtenidas de las ramas superiores (Gutiérrez, 1995; Rivera *et al.*, 2016).



Figura 11. Brotes y plantas generados a partir de esquejes de *Tilia americana* var. *mexicana*: a) yemas apicales 8 días de cultivo, b) yemas axilares 25 días de cultivo, c) plantas en condición de invernadero y d) planta en condiciones medioambientales.

El tipo de sustrato empleado es otro factor importante en el enraizamiento de esquejes de especies leñosas, estudios han demostrado que la vermiculita y turba tienen mayor capacidad de retención de agua y menor porosidad que la perlita, debido a que el exceso de humedad reduce el oxígeno e inhibe la formación inicial de raíz o estimula la presencia de hongos patógenos (Rivera *et al.*, 2016).

Los esquejes para convertirse en plantas vegetativas completas requieren la formación de raíces adventicias, las cuales aparecen en el interior del tallo y tras su posterior crecimiento atraviesan los tejidos periféricos y aparecen visibles en el exterior. La formación de estas raíces se ve favorecida cuando se usan hormonas vegetales como el AIB a dosis adecuadas, las cuales estimulan la iniciación meristemática radical, aumentan el número y la calidad de las raíces formadas (Martínez y Aguila, 2005).

El 100% de los esquejes de *T. americana* colectados en el mes de Septiembre de tamaños de 20 x 1.5 cm enraizaron, seguido de los esquejes de 15 x 1.5 cm (92%). Las estacas de 20 x 1.0 cm formaron el mayor número de raíces (3.4%) con valores promedio de 3.3 raíces por estaca. El 85% de las estacas de *T. cordata* Mill colectadas en el mes de agosto se enraizaron utilizando 35,000 mg/L de AIB y el 100% de las estacas de *T. americana* colectadas en mayo y plantadas a finales de

junio (Muñoz *et al.*, 2011). Sin embargo, contrario a este trabajo (Figura 11c-d) en ninguno de estos trabajos se reporta la obtención de plantas completas por medio del enraizamiento de estacas de especies del género *Tilia*. Las estacas colectadas en el verano forman raíces más rápido y en mayor cantidad. En algunas plantas su enraizamiento ocurre todo el año, pero en otras, sólo en una estación en particular; por ejemplo, para los álamos sucede en primavera (marzo-junio) y no tienen éxito en invierno (Muñoz *et al.*, 2011).

El enraizamiento de los esquejes de *T. americana* var. *mexicana* (Figura 11), quizá está ligada con la época de colecta la cual se realizó en el mes de septiembre, así como a la predisposición hormonal de acuerdo a su ciclo fenológico. A finales de octubre se presenta la defoliación de los árboles; los brotes foliares comienzan a desarrollarse durante febrero, seguidos por la extensión de la hoja completa, los brotes florales están presentes en abril y la floración máxima a finales de junio. La fructificación comienza en julio y la mayoría de las frutas se dispersan en el viento en septiembre (Pavón, 2000), estos cambios estacionales son importantes porque modifican las hormonas de las plantas y esto podría ser un factor importante para su enraizamiento (Muñoz, 2011).

7.2 Desinfección de explantes de *Tilia americana* var. *mexicana*

Se escogieron brotes jóvenes obtenidos de los esquejes de *T. americana* var. *mexicana* con las mejores características fenotípicas y fisiológicas en cuanto a la ausencia de fitopatógenos y microorganismos que pudieran intervenir en el proceso de desinfección del material vegetal. El cultivo aséptico de yemas apicales y axilares de *T. americana* var. *mexicana* (95% viables) se obtuvo con 0.5% de extrán durante 5 min y 0.7% de NaOCl durante 15 min, condiciones que permitieron la obtención de explantes con baja oxidación a los 30 días de cultivo (Figura 12a-c).

La desinfección de explantes es una de las principales dificultades que comúnmente se presentan en el cultivo *in vitro*, debido a la presencia de microorganismos. Otro factor es la edad fisiológica del tejido, ya que el material vegetal proveniente de explantes en crecimiento es más fácil de desinfectar en comparación con el obtenido de plantas maduras, los depósitos de ceras y ligninas son mayores, convirtiéndose

en una barrera para la acción del agente desinfectante sobre los microorganismos, los cuales afectan la viabilidad y el desarrollo de los explantes. Por ello, es importante establecer métodos de desinfección que permitan eliminar dichos microorganismos sin afectar la viabilidad de los explantes (García *et al.*, 2015).

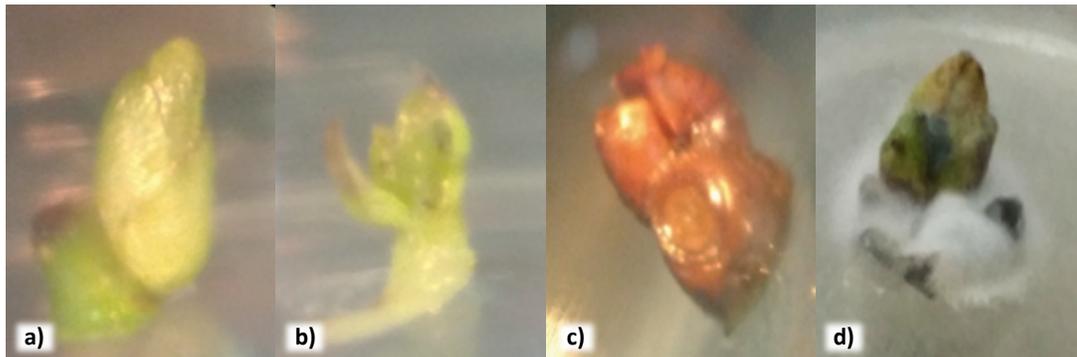


Figura 12. Desinfección con extrán y NaOCl de explantes de *Tilia americana* var. *mexicana*: a) yema axilar, b) apical y c) oxidación a 30 días de cultivo y d) contaminación a 7 días de cultivo.

El uso de químicos con una base de cloro son ampliamente utilizados en la desinfección de la superficie vegetal, los principales son las soluciones de NaOCl e CaOCl al 1-5% (v/v) (Cabrera y González, 2016). Por ejemplo, en la desinfección de segmentos nodales de *Grevillea robusta* A. Cunn, se realizó un pre-tratamiento consistente a un cepillado fuerte con una solución acuosa de NaOCl (0.25 g/L) y posteriormente se transfirieron a distintos tratamientos con agentes desinfectantes o fungicidas en diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Los mejores resultados se lograron con el pre-tratamiento de NaOCl (0.25 g/L) y carbendazim (0.75 g/L) por 15 min, permitió el 96.67% de explantes fueron viables y presentaron baja oxidación (6.67%). El NaOCl presenta como ventajas que se enjuaga fácilmente, se consigue en presentación comercial de uso doméstico y es económico (Bogado *et al.*, 2016). Cuando se diluye en agua, las sales de hipoclorito forman ácido hipocloroso (HClO), el cual reacciona con una amplia variedad de compuestos subcelulares, particularmente con NH_4 y aminas orgánicas para formar cloraminas altamente tóxicas que son compuestos oxidantes y clorantes fuertes (Miché y Balandreau, 2001).

Otro agente desinfectante utilizado en el cultivo *in vitro* es el HgCl_2 pero es necesario evitar su uso en la medida de lo posible ya que es altamente tóxico y activo a bajas concentraciones, presenta acción carcinogénica, afectando principalmente a glándulas mamarias y al sistema reproductor femenino, así mismo daños a nivel del sistema nervioso central; se recomienda evitar su eliminación por el drenaje debido a que se bioacumula a lo largo de la cadena alimentaria y tiene efectos prolongados en el medio ambiente; otros agentes son el H_2O_2 , el KMnO_4 , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, entre otros (Cabrera y González, 2016; Bogado *et al.*, 2016). En la desinfección superficial de segmentos nodales de *T. platyphyllos* se empleó una solución de CaOCl al 7.5% (p/v) durante 20 min y una solución de HgCl_2 al 0.1-0.2% durante 20-40 min, después se enjuagaron con agua estéril por tres veces y se colocaron en el medio de cultivo (Chalupa, 2003).

La mayor oxidación apareció en el área de disección y progresivamente se extendió hacia el resto del tejido vegetal (Figura 12c), debido a la segregación de compuestos fenólicos generando necrosis y apoptosis (Azofeifa, 2009; García *et al.*, 2015; Bogado *et al.*, 2016). Por ello, también es importante la utilización de sustancias que previenen o minimizan la producción y liberación de fenoles, como los antioxidantes, uno de los más utilizados es el PVPP, aplicado durante el enjuague del explante o mediante su incorporación al medio de cultivo para atrapar los compuestos quelantes (Azofeifa, 2009; Bogado *et al.*, 2016).

7.3 Inducción de brotes y callos

El tejido embrionario que se utilizó como explante inicial fueron las yemas axilares y apicales obtenidas de los brotes de los esquejes de *T. americana var mexicana*. Diferentes respuestas se obtuvieron como resultado al efecto de BA y TDZ combinadas con una concentración única de ANA (0.25 mg/L) y AIB (0.1 mg/L) respectivamente; resaltando la formación de brotes sin la formación de raíces, desarrollo de hojas y la formación de callo sin potencial embriogénico. El tipo de respuesta estuvo determinada en función del tipo y la concentración de la fitohormona empleada. El tratamiento control no mostró respuesta a la formación de brotes, solo un 15% en ambos tipos de yemas presentó la elongación del tallo y

desarrollo de 2 hojas muy pequeñas, ambos órganos mostraron un color verde desde los 30 hasta los 90 días de cultivo. Esta misma respuesta se observó también en los explantes colocados en los distintos tratamientos evaluados únicamente a los 30 días de cultivo. Los resultados del análisis de varianza mostraron que el porcentaje de brotes (35-50%) generados en yemas apicales fue similar en los distintos tratamientos ($p>0.05$) (Tabla 6).

El medio de cultivo MS complementado con las concentraciones más bajas de BA (0.5 mg/L) presentó la formación de 2 y 2-4 brotes/explante respectivamente, con el desarrollo de 2 hojas por brote a los 60 días de cultivo (Tabla 6). Sin embargo, a los 90 días de cultivo se observó que el mayor porcentaje de brotes (75%) se presentó en el tratamiento con 2.0 mg/L de BA combinada con 0.25 mg/L de ANA ($p<0.05$), con la formación de 2-3 brotes/explante y la formación de 2 hojas/brote, en ambos tiempos de cultivo las hojas fueron de color verde, en forma de corazón y dentadas en las yemas apicales (Tabla 6, Figura 13c).

Las yemas axilares que se cultivaron en el medio de cultivo MS con la concentración más baja (0.5 mg/L) de BA, presentó el mejor efecto en cuanto a la formación de brotes/explante (55 %) ($p<0.05$), con la formación en promedio de 2 brotes/explante a los 60 días de cultivo, efecto que se mantuvo hasta los 90 días de cultivo (60% y 2-3 brotes/explante), en ambos tiempos de cultivo sólo se desarrollaron 2 hojas/brotes de color verde (Figura 13d).

Las yemas apicales cultivadas en medio MS complementado con las concentraciones más bajas (0.5 y 0.005 mg/L) de BA y TDZ presentaron la formación de 2 y 2-4 brotes/explante respectivamente, con el desarrollo de 2 hojas por brote a los 60 días de cultivo (Tabla 6). Sin embargo, a los 90 días de cultivo se observó que el mayor porcentaje de brotes (75%) se presentó en el medio MS complementado con 2.0 mg/L de BA combinado con 0.25 mg/L de ANA ($p<0.05$), con la formación de 2-3 brotes/explante y 2 hojas/brote. En ambos tiempos de cultivo las hojas fueron de color verde, en forma de corazón y dentadas (Tabla 6, Figura 13).

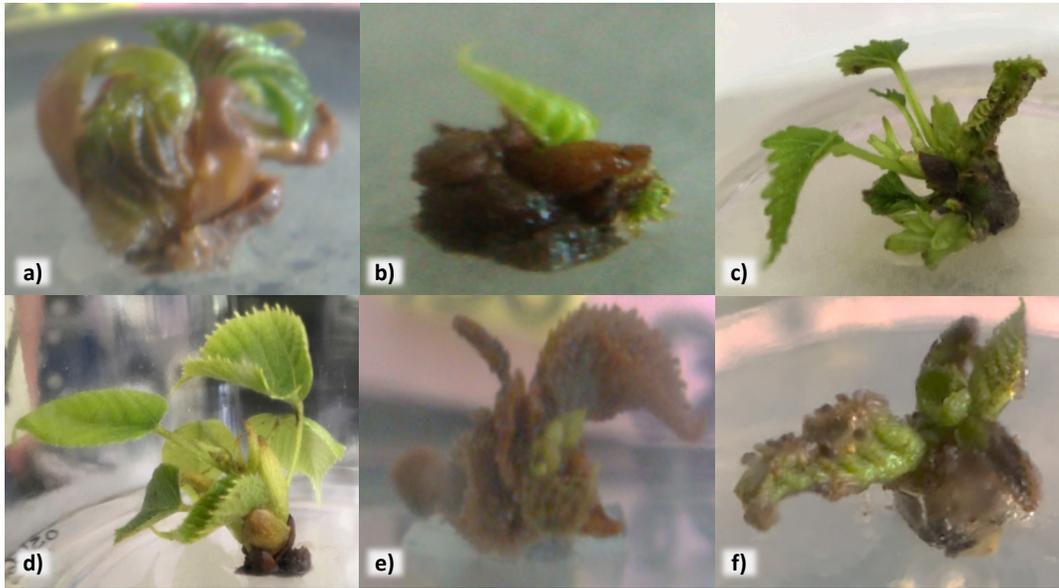


Figura 13. Brotes de explantes de yemas apicales (arriba) y axilares (abajo) de *Tilia americana* var. *mexicana* cultivadas en medio MS suplementado con BA: (a y d) 0.5 mg/L, (b y e) 1.0 mg/L y (c y f) 2.0 mg/L en combinación con 0.25 mg/L de ANA a los 90 días de cultivo.

Los explantes de yemas apicales de *T. americana* var. *mexicana* cultivado en medio MS con las diferentes concentraciones de TDZ evaluadas, no presentaron diferencias significativas en la formación de brotes (20 a 50%). En el tratamiento con 0.005 mg/L de TDZ se desarrollaron 4 brotes/explante (Figura 14a), y en los demás tratamientos 2 brotes/explante. Los brotes fueron de color verde, con el desarrollo de 2 a 4 hojas dentadas por brote (Figura 14b-f). Los brotes y las hojas fueron más pequeños que aquellos que se cultivaron en los tratamientos con BA/ANA.

Tabla 6. Efecto de las concentraciones de 6-Bencil aminopurina (BA) y tidiazurón (TDZ) en el desarrollo de brotes y callos en yemas apicales y axilares de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Explante	Tiempo (Días)	Tratamientos (mg/L)		Explantes con brotes (%)	Distribución de Fisher (F)	Probabilidad (p)	Explantes (%) / número de brotes	Explantes con callo (%)	Distribución de Fisher (F)	Probabilidad (p)
		BA	TDZ							
Yema Apical	60	0.5	-	50	NS		10 (2)	15	26.06	0.0001
		1.0	-	50			-	15		
		2.0	0.005	40			-	5		
		-	0.01	45			20 (2-4)	50**		
		-	0.02	50			-	50**		
		-	-	35			-	55**		
	90	0.5	-	55	2.76	0.1	15 (2)	15	58.11	0.0001
		1.0	-	50			-	20		
		2.0	-	75**			35 (2-3)	5		
		-	0.005	45			45 (2-4)	60**		
		-	0.01	50			-	70**		
		-	0.02	14			4 (2)	80**		
Yema Axilar	60	0.5	-	55**	5.12	0.008	25 (2)	20	11.75	0.0008
		1.0	-	25			-	25		
		2.0	-	10			-	45		
		-	0.005	20			-	65**		
		-	0.01	0			-	60**		
		-	0.02	20			-	55**		
	90	0.5	-	60**	5.66	0.005	30 (2-3)	20	12.56	0.0006
		1.0	-	25			-	40		
		2.0	-	10			-	65		
		-	0.005	20			-	70		
		-	0.01	0			-	65		
		-	0.02	25			-	80**		

BA combinado con 0.25 mg/L de ANA, TDZ combinado con 0.1 mg/L de AIB, NS = No significativo, de acuerdo al análisis de varianza y post-prueba de Tukey_{0.05 brotes} = Tukey_{0.05 callo} = valores de explantes con brotes y/o explantes con callo con ** son estadísticamente mejores.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo son diferentes a los obtenidos por Zurita *et al.*, 2014 quien reporta la generación de 7.75 brotes/yema apical provenientes de plántulas, a los 60 días de cultivo empleando 1.0 mg/L de BA en combinación con 0.25 mg/L de ANA.

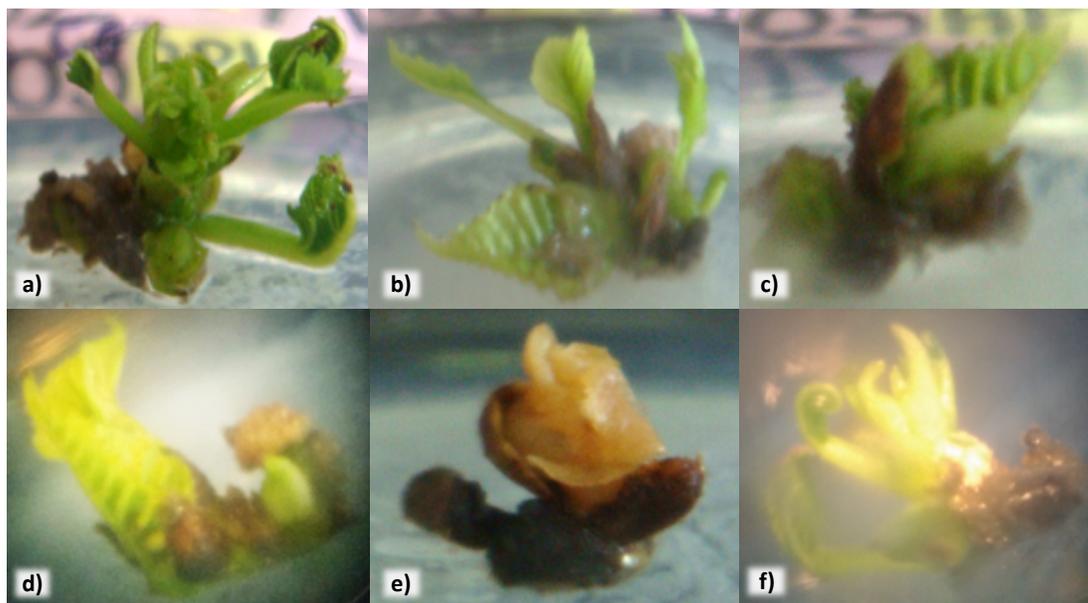


Figura 14. Brotes de explantes de yemas apicales (arriba) y axilares (abajo) de *Tilia americana* var. *mexicana* cultivadas en medio MS suplementado con TDZ: (a y d) 0.005 mg/L, (b y e) 0.01 mg/L y (c y f) 0.02 mg/L en combinación con 0.1 mg/L de AIB a los 90 días de cultivo.

Sin embargo, la formación de brotes (2-3 brotes/explante) en yemas axilares de *T. americana* var. *mexicana* cultivadas en la concentración más baja (0.5 mg/L) de BA combinada con 0.25 mg/L de ANA, fue similar a lo reportado para diferentes tejidos (yemas axilares de plántulas, 3.3 ± 1.5 ; de brotes epicórmicos de árboles maduros, 2.5 ± 1.2) y de ramas de bajo crecimiento de árboles maduros, (2.3 ± 1.2) de *T. platyphyllus*, cultivados en medio MS suplementado con concentraciones bajas de BA o BAP (0.2-0.4 mg/L) combinada con 0.1 mg/L de AIB (Chalupa, 2003). En la proliferación de brotes de *T. cordata* Mill, BA a bajas concentraciones (0.2-0.6 mg/L) estimuló el crecimiento (4.7 a 6.1 brotes/explante) y alargamiento de los brotes (2.3 a 2.5 cm). El número de brotes producidos en medios suplementados con una baja concentración de BA fue significativamente mayor que el control (1.3 brotes/explante). Al incrementar la concentración de BA (1.0 mg/L) se incrementó el

número de brotes (7.3 brotes/explante). La concentración de 4.0 mg/L de BA generó brotes (1.6 cm) más largos (Chalupa, 1987). Algunos autores sugieren que para conseguir la multiplicación de brotes en yemas de plantas adultas de *Tilia* spp, se deben adicionar concentraciones altas de BA (1.0-5.0 mg/L), y tener un balance preciso de los componentes del medio para interactuar con el tejido y determinar la respuesta morfogénica, especialmente de la interacción cuantitativa entre auxinas y citocininas, además, de tomar en cuenta los factores abióticos como son la luz, temperatura, entre otros (Zurita *et al.*, 2014).

Las citocininas incorporadas a los medios de cultivo promueven el desarrollo de las yemas laterales al contrarrestar la dominancia apical y estimular la expansión foliar por efecto del alargamiento celular. Principalmente promueven la división celular, aunque el efecto puede variar según el estado de diferenciación de las células, inducen la formación de órganos, el desarrollo de brotes, estimulan la movilización de nutrientes y la síntesis de clorofila; también son capaces de estimular la síntesis de ARN y proteínas. Al parecer en el cultivo de tejidos vegetales, estas fitohormonas actúan incrementando la rapidez de la síntesis de proteínas, algunas de las cuales podrían ser enzimas o proteínas estructurales necesarias para la mitosis (Chamorro *et al.*, 2007; Vilchez *et al.*, 2009).

Las yemas apicales formaron callos (50-55%) en los medios de cultivo complementados con TDZ y no hubo diferencias significativas entre la concentración empleada de TDZ a los 60 días de cultivo (Tabla 6), el efecto se mantuvo hasta los 90 días de (60-80%) ($p < 0.05$). Los callos generados eran friables, de color beige claro y con zonas de color rosas a rojo (Figura 15a-c). En los tratamientos con BA la respuesta de callogénesis fue menor (5-20%), el callo fue muy pequeño y de color café (Figura 16a-c) a los 90 días de cultivo.

Las yemas axilares presentaron un efecto similar a las yemas apicales, la callogénesis se presentó principalmente en los tratamientos constituidos por TDZ (60-65%) y no se presentaron diferencias significativas en cuanto a la concentración ($p < 0.05$) empleada de TDZ a los 60 días de cultivo (Tabla 6). Sin embargo, a los 90 días de cultivo la mayor respuesta a callogénesis ($p < 0.05$) se presentó en el medio

de cultivo MS complementado con 0.02 mg/L de TDZ (80%), seguido del tratamiento con 0.005 mg/L (70%) de TDZ (Tabla 6).

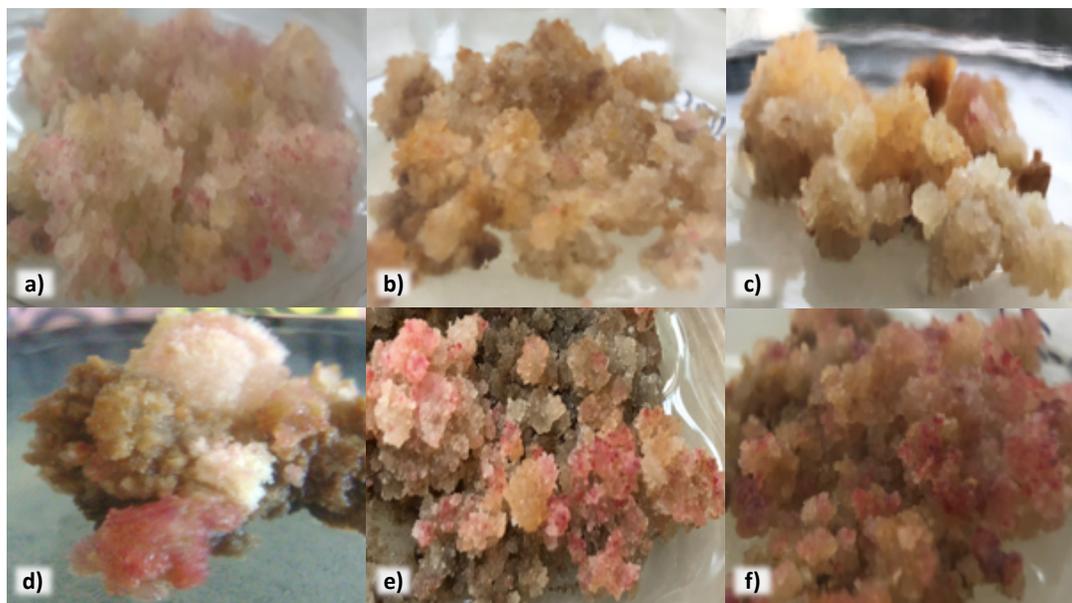


Figura 15. Calogénesis de explantes de yemas apicales (arriba) y axilares (abajo) de *Tilia americana* var. *mexicana* cultivadas en medio MS suplementado con TDZ: (a y d) 0.005 mg/L, (b y e) 0.01 mg/L y (c y f) 0.02 mg/L en combinación con 0.1 mg/L de AIB a los 90 días de cultivo.

Los callos en los tratamientos con TDZ fueron de color beige claro con zonas rosas-rojo, de naturaleza friable y esponjosos (Figura 15d-f). En los tratamientos con BA la respuesta mejor (65%) se presentó en el tratamiento con 2.0 mg/L, en general los callos fueron de color café con pequeños pigmentos rosa-rojo y beige, su crecimiento fue menor comparado con aquellos que se cultivaron en TDZ (Figura 16d-f) a los 90 días de cultivo.

Los resultados obtenidos en este trabajo para yemas axilares son muy similares a los reportados por Chalupa, 2003, quien reporta el mayor número de brotes (5.2 brotes/explante) al utilizar 0.005 mg/L de TDZ en combinación con 0.1 mg/L de AIB a las 6 semanas de cultivo. Además, el autor reporta que los medios de cultivo suplementados con bajas concentraciones de TDZ estimularon la formación del mayor número de brotes, aunque su elongación fue lenta y sus hojas más pequeñas, en comparación a los cultivados en el medio MS complementado con bajas concentraciones de BA o BAP. La utilización de altas concentraciones de TDZ (2.0 mg/L) inhibió la elongación de los brotes (Chalupa, 2003).

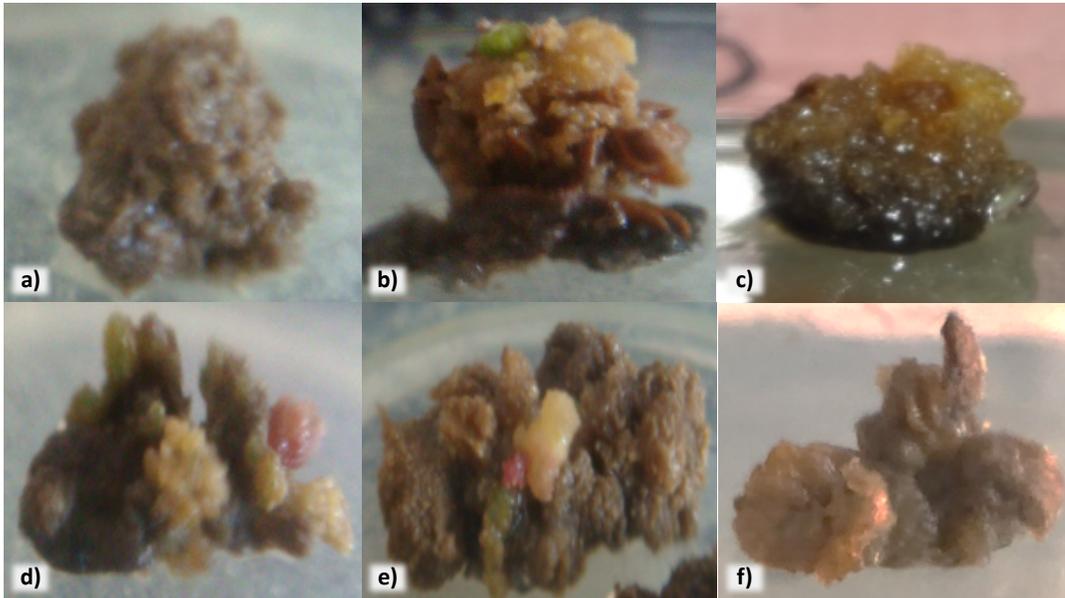


Figura 16. Calogénesis de explantes de yemas apicales (arriba) y axilares (abajo) de *Tilia americana* var. *mexicana* cultivadas en medio MS suplementado con BA: (a y d) 0.5 mg/L, (b y e) 1.0 mg/L y (c y f) 2.0 mg/L en combinación con 0.25 mg/L de ANA a los 90 días de cultivo.

En brotes de *T. cordata* Mill, las concentraciones bajas (0.002-0.01 mg/L) de TDZ estimularon la formación de brotes axilares (9.5 a 15.2 brotes), los brotes elongaron lentamente y sus hojas fueron pequeñas comparados con aquellos que crecieron en BA (Chalupa, 1987).

Sin embargo, la proliferación de brotes utilizando TDZ, no siempre es posible, en otras especies vegetales como por ejemplo en yemas axilares de 1.0 cm de *Camellia sinensis*, se indujo la calogénesis (94-97%) en todos los explantes cuando se utilizó TDZ (5, 10 y 15 μ M) en combinación de diferentes concentraciones (5, 10 y 15 μ M) de 2,4-D o IBA en ambos medios de cultivo empleados (Mondal *et al.*, 1998). El TDZ es una citocinina potente para promover la formación de callos a partir de plantas leñosas, especialmente cuando se usa a concentraciones $\geq 0.1 \mu$ M (Huetteman y Preece, 1993). En 1982, se reportó que bajas concentraciones de TDZ estimulaban el crecimiento de callos en *Phaseolus lunatus*; la respuesta a zeatina para formar callos fue menor (Lu, 1993). Se cree que el crecimiento de callos inhibe la proliferación de brotes axilares en plantas leñosas. Por ejemplo, altas concentraciones de TDZ (1-50 μ M) favorecen la producción de callos de nogal a

expensas del crecimiento axial del brote; igualmente concentraciones de TDZ ≥ 1.0 μM estimularon el crecimiento del callo mientras inhiben el crecimiento del brote axilar del arce plateado (Huetteman y Preece, 1993).

El TDZ es un compuesto nitrogenado, que pertenece al grupo de las fenilúreas sustituidas, ampliamente utilizado como herbicida, con actividad similar a la citocinina que estimula altas tasas de regeneración y proliferación de brotes en muchas especies leñosas (Mondal *et al.*, 1998; Huetteman y Preece, 1993) como el híbrido de arce, la manzana, la azalea, el arce plateado, la pera, el durazno, entre otros. En híbridos de arce rojo-plateado no se produjeron brotes al utilizar CN, 2-indolaminopurina (2ip) o BA, en contraste se obtuvieron 3 a 10 brotes axilares/explante después de cultivar las yemas apicales en medio con 0.0022 a 0.011 mg/L de TDZ. En otras situaciones la concentración de TDZ es similar a la de BA, por ejemplo, en melocotón TDZ produjo callo excesivo y una mínima proliferación de brotes, mientras que la multiplicación de brotes fue mayor con BA (Lu, 1993).

7.4 Sistemas de inmersión temporal (SIT)

El interés en el uso de medios líquidos en micropropagación y en particular el uso de SIT, ha incrementado en la última década, debido a que el SIT garantiza mayores tasas de multiplicación. En este trabajo, se utilizaron los SIT tipo RITA[®], en ellos, los explantes de yemas apicales de *T. americana* var. *mexicana* se cultivaron en el medio líquido MS complementado con la combinación hormonal determinada en medio sólido para estimular la formación de brotes (2.0 mg/L de BA combinada con 0.25 mg/L de ANA), a un tiempo de inmersión de 3 min y una frecuencia de 8 h (Figura 17a).

A los 60 días cultivo, los explantes solo presentaron elongación y la generación de 2 hojas muy pequeñas de color verde (15%); el 70% de los explantes permanecieron verdes; el 15% de ellos presentó zonas de color café oscuro. A los 90 días de cultivo, no se presentó la formación de brotes, el 30% de los explantes elongaron con 2

hojas muy pequeñas de color verde, el 10% de los explantes no respondió y el 60% de los explantes se oxidaron (Figura 17b).

Los explantes de yemas axilares de *T. americana* var. *mexicana* se cultivaron en el medio líquido MS con 0.5 mg/L de BA combinada con 0.25 mg/L de ANA en el RITA®, a un tiempo de inmersión de 3 min y una frecuencia de 8 h (Figura 17a). A los 5 días de cultivo, todos los explantes presentaron hiperhidratación, la cual se hizo más evidente a los 15 días observando explantes con zonas blancas y oscuras (Figura 17b).

Con estos resultados se optó en el cambio de tiempo de inmersión a 1 min con la misma frecuencia de 8 h. Desde los 60 hasta los 90 días de cultivo, en el 25% de los explantes se observó el desarrollo de callo de color café oscuro (Figura 17c). La frecuencia y los tiempos de inmersión empleados en los RITA® no estimularon el tejido para la formación de brotes de *T. americana* var. *mexicana*. El callo desarrollado en los RITA® comparado con los que se desarrollaron en los medios sólidos empleando los mismos fitoreguladores, eran friables y pequeños, de color café oscuro posiblemente, al estrés ocasionado por la desecación y/o daños mecánicos sufridos mediante el funcionamiento de los RITA®. Esto pudo ocasionar, la segregación de compuestos fenólicos secretados como mecanismo de defensa y/o estrés del explante.

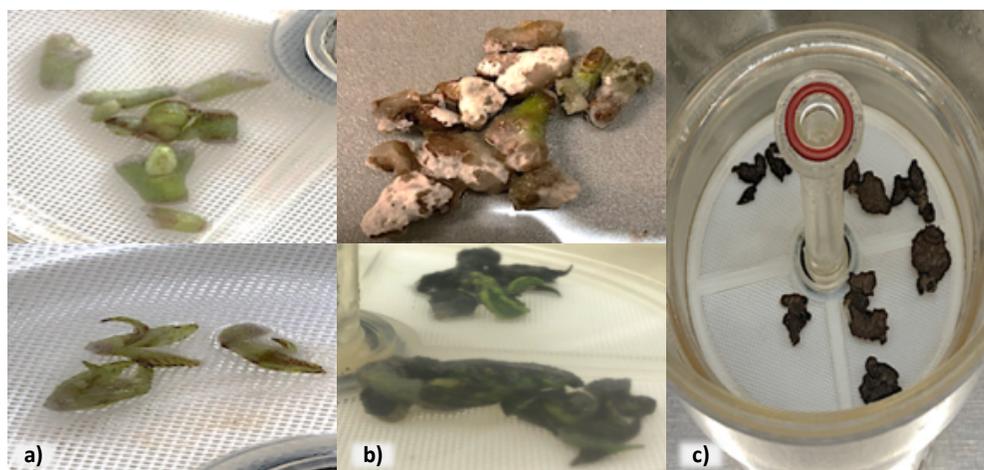


Figura 17. Sistemas de inmersión temporal tipo RITA® de explantes de *Tilia americana* var. *mexicana*: a) yemas axilares (arriba) y apicales (abajo) a 1 día de cultivo, b) yemas axilares (arriba) y apicales (abajo) a una frecuencia/tiempo de inmersión 8 h/3 min y c) yemas axilares a una frecuencia/tiempo de inmersión 8 h/1 min a los 90 días de cultivo.

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular. La célula vegetal sometida a un estrés reacciona produciendo mayores niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), los cuales generan una reacción en cascada, cuando el electrón libre se transfiere de una molécula a otra (Azofeifa, 2009; Pequeño *et al.*, 2015). Factores ambientales como: intensidad de luz, cortes, herbicidas, senescencia, patógenos, metales pesados, lesiones, sustancias abrasivas pueden desencadenar el estrés oxidativo (Yang *et al.*, 2018). En el caso del CTV *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo, los que pueden liberar compuestos fenólicos, los cuales son tóxicos para los tejidos vegetales, provocando cese al crecimiento, oscurecimiento del tejido, exudados que oscurecen el medio de cultivo y en algunos casos la muerte del explante (Jiménez y Abdelnour, 2016).

Por ejemplo, en células de *Pinus virginiana*, correlacionaron la muerte celular con altos contenido de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Asimismo, en la etapa de establecimiento *in vitro*, luego de ser cortados, muchos de los explantes empezaron a perder el color verde e iniciaron un oscurecimiento, liberando exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, aunque se conoce que son una mezcla de compuestos fenólicos (metabolitos secundarios que modulan el desarrollo de la planta y su respuesta al estrés biótico y abiótico). Por ejemplo, en explantes de tomate se ha reportado la presencia de vainilina, ácido *p*-coumárico, *p*-hidroxibenzaldehído y siringaldehído. No todos los exudados liberados al medio de cultivo pueden ser inhibitorios o tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir. La toxicidad de los exudados está en relación con el incremento en la producción de compuestos fenólico ya que

estos con oxidados para formar quinonas, debido a la actividad de enzimas oxidativas, y posteriormente polimerizados. Además, se puede deber a la oxidación de proteínas, ya que fenoles se unen con proteínas mediante puentes de hidrógeno, a la acción de enzimas peroxidasas, las cuales pueden catalizar su oxidación en presencia de H₂O₂. Este y otros radicales libres son liberados o generados durante el proceso de escisión, limpieza, desinfección y cultivo del explante. Aparte del oscurecimiento de explantes, al estrés oxidativo se ha relacionado con el desencadenamiento de otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia, hiperhidricidad y variación somaclonal (Azofeifa, 2009).

Efecto contrario a los reportados en la multiplicación *in vitro* de diferentes especies vegetales, como *Vitis nifera* (uva), *Daucus carota* (zanahoria), *Musa* spp. (banano y plátano), *Solanum tuberosum* (papa), *Hevea brasiliensis* (caucho), *Coffe arabica* (café), *Saccharum* spp (caña), *Ananas comosus* (piña) y *Potinera* spp. (orquídea), entre otras (Etienne y Berthouly, 2002). Por ejemplo, en la multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L., se utilizaron explantes de yemas axilares cultivadas en el medio de cultivo WPM con 1.0 mg/L de BA y 0.01 mg/L de Brasinoesteroide (DI-31) sin agente gelificante, se evaluó el efecto del cultivo SIT tipo BIT[®] y RITA[®], a los tiempos (1 y 2 min) y frecuencia (3 y 4 veces/día) de inmersión. Después de 6 semanas de cultivo, con el empleo de SIT se logró incrementar el número de brotes (2.17), entrenudos (3.5) y el diámetro y la longitud de los brotes (10.7 mm, 2.8 cm).

La vitrificación o hiperhidratación ocurre en los tejidos vegetales que disponen de gran cantidad de agua, además, el material vegetal joven y tierno es más susceptible a la vitrificación; otros factores que pueden estar asociados son los altos niveles de citocininas, la deficiencia en el intercambio gaseoso, la irradiancia lumínica, las altas temperaturas, entre otros (Tirado *et al.*, 2005). En este trabajo, el tiempo de inmersión fue de 3 y 1 min para los explantes de yemas apicales y axilares, y estos se colocaron sobre una malla en los RITA[®]; en algunos casos se observó que no había una buena evacuación del medio de cultivo, quedando restos alrededor de los explantes. Además, en ciertos periodos fue posible observar gotas de rocío en las paredes del RITA[®], ambos efectos generaron la alteración del tiempo

de inmersión. Además, los explantes axilares se caracterizan por tener forma de “Y” con 3 cortes (heridas) con mayor contacto con el medio de cultivo generando la hiperhidratación, liberación de compuestos fenólicos. El tiempo de inmersión utilizado en los SIT varía considerablemente dependiendo del tipo de especie, el proceso de micropropagación y el tipo de SIT utilizado (Tirado *et al.*, 2005).

7.5 Extracción y aislamiento de compuestos activos

El análisis de HPLC de los extractos metanólicos de hojas de árboles silvestres de *T. americana var. mexicana* y callos derivados de explantes de hojas cultivados en medio MS suplementado con 2,4-D y yemas apicales con TDZ, indica la presencia de compuestos del tipo flavonoides y cumarinas. Con base a los tiempos de retención y los espectros de adsorción se identificó la presencia de los compuestos: 3- β -D-glucósido de quercetina (tr = 9.22 min) y escopoletina (tr = 11.155 min), y tilirósido (tr = 17.481 min) únicamente presente en el extracto de hojas del árbol y la biomasa de callo de yema apical (Figura 18a-c) (Figura 19).

La presencia de estos compuestos ya ha sido reportada en extractos metanólicos y acuosos en bracteas de *T. americana var. mexicana* mediante el análisis por HPLC (Avilés; 2008; Herrera Ruíz *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2009; Aguirre *et al.*, 2010; Noguerón *et al.*, 2015).

Así mismo, se ha corroborado la producción del flavonoide 3- β -D-glucósido de quercetina, y de las cumarinas esculina, esculetina, escopoletina y escopolina, en callos friables de *T. americana var. mexicana*, obtenidos a partir de explantes de hojas de brotes de estacas utilizando el medio de cultivo MS complementado con 30 g/L de sacarosa, 1 mg/L de PVPP, 3 g/L de fitagel, como reguladores del crecimiento vegetal 2.0 mg/L de 2,4-D con 0.5 mg/L de CN (Cisneros-Torres *et al.*, 2019).

En extractos polares de otras especies de *Tilia* como son: *T. cordata*, *T. rubra*, *T. argentea* y *T. platyphyllos*, se han reportado sus componentes mayoritarios: 3-O-glucósido de quercetina, astragalina, quercetrina, camferitrina, 3-O-ramnósido de canferol y tilirósido (Martínez *et al.*, 2009; Aguirre *et al.*, 2010).

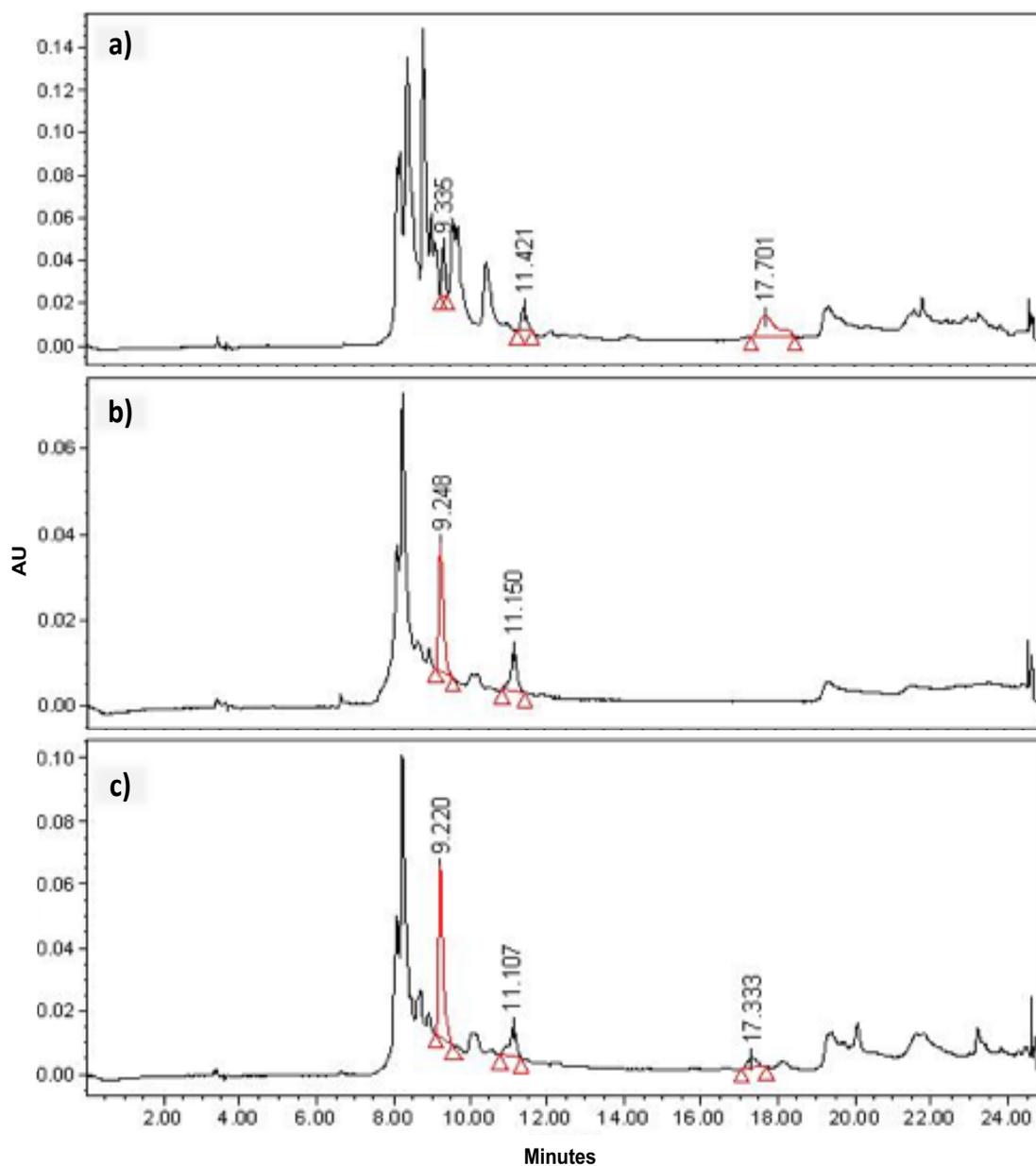


Figura 18. Cromatogramas de HPLC de los compuestos 3-β-D-Glucósido de quercetina (9.22 min), escopoletina (11.155 min) y tilirosido (17.481 min) detectados en los extractos metanólicos de: a) hojas del árbol silvestre, b) callo obtenido de hojas y c) Callo obtenido de yemas apicales de *Tilia americana* var. *mexicana* a $\lambda = 355$ nm.

Por medio del análisis del contenido de 3-β-D-glucósido de quercetina y escopoletina realizado a los extractos metanólico de hojas del árbol, biomasa de callo proveniente de yema apical y de hojas de *T. americana* var. *mexicana*, se puede determinar que la escopoletina se encuentra en mayor proporción en las

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

hojas del árbol (11.30 $\mu\text{g/g}$ biomasa), mientras que el 3- β -D-glucósido de quercetina fue superior en la biomasa de callo de yema apical (115.86 $\mu\text{g/g}$ biomasa) y el contenido de tilirósido fue similar en las hojas del árbol (97.38 $\mu\text{g/g}$ biomasa) y la biomasa de callo (88.24 $\mu\text{g/g}$ biomasa) (Tabla 7) (Figura 18a-c).

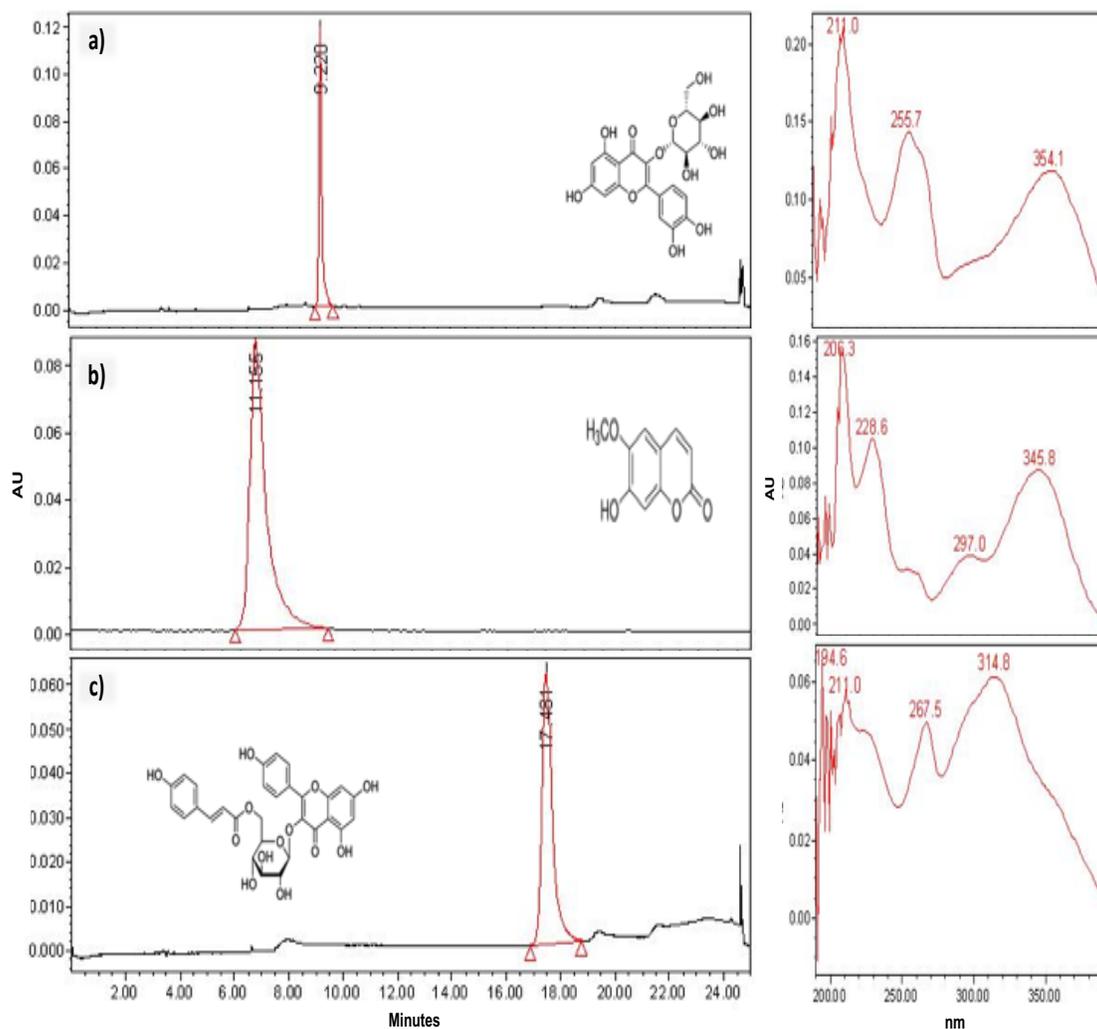


Figura 19. Cromatogramas de HPLC y espectros de absorción de los estándares: a) 3- β -D-glucósido de quercetina, b) Escopoletina y c) Tilirósido a $\lambda = 355$ nm.

Las diferencias encontradas entre la producción y contenido de estos metabolitos secundarios se deben posiblemente al tiempo de colecta de la planta (Septiembre 2015), ya que las condiciones fisiológicas de la planta cambian con las estaciones y los diferentes factores del medio ambientales como la luz, temperatura, agua, tipo

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

de suelo y la salinidad (Figuereido *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2018).

Tabla 7. Contenido de compuestos activos en los extractos metanólicos de hojas y callos de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Tejido vegetal	Concentración (µg/g biomasa)		
	Escopoletina	3-β-D-Glucósido de quercetina	Tilirósido
Hojas del árbol	11.30±0.42**	23.55±2.74	97.38±9.62
Callo de yema apical ^a	7.64±2.30	115.86±4.02**	88.24±1.01
Callo de explante de hoja ^b	4.47±6.01	55.10±5.00*	ND
Probabilidad (p)	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Valores con ** y * son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey 0.005 (p<0.05), ND=No Detectado.

^aCallo de yema apical cultivado en medio MS con 0.005 mg/L de TDZ combinado con 0.1 mg/L de AIB

^bCallo de yema de explante de hoja cultivado en medio MS con 1.0 mg/L de 2,4-D combinado con 0.5 mg/L de CN.

En un estudio se realizó la colecta de inflorescencias de *T. americana* L. var. *mexicana* (Schltdl.) Hardin en tres regiones de México (Omiltemi, Guerrero; Tenango de Doria, Hidalgo y Coacoatzintla, Veracruz), el análisis por HPLC-MS de los extractos metanólicos de brácteas y flores, permitió determinar la presencia de flavonoides: en las muestras de Guerrero, Hidalgo y Veracruz no se detectó quercetina en ambas partes vegetativas (brácteas y flores): la rutina solo estuvo presente en brácteas de Veracruz y Guerrero, pero no se observó en las muestras de Hidalgo; isoquercetrina en las flores de Guerrero y Veracruz; las brácteas en Hidalgo; el tilirósido en flores y brácteas de Guerrero, Hidalgo y Veracruz, entre otros flavonoides. Las diferencias en la concentración de flavonoides podrían estar asociadas a la variación ambiental o al área geográfica donde se recolectaron (Aguirre *et al.*, 2010; Aguirre *et al.*, 2016).

Las plantas producen una gran variedad de compuestos bioactivos y metabolitos secundarios (MS), los cuales permiten que las plantas interactúen con el medio ambiente en su adaptación a las condiciones de estrés biótico y abiótico. Los MS participan en la protección contra herbívoros, bacterias, hongos, virus e incluso otras

plantas competidoras. Además, algunas plantas utilizan a los MS como señales de comunicación entre plantas y microorganismos simbióticos, sirven para atraer polinizadores y dispersores de semillas (Sepúlveda *et al.*, 2003; Vélez-Terranova *et al.*, 2014).

La síntesis y acumulación de componentes fitoquímicos depende críticamente de las condiciones ambientales. Para la mayoría de las plantas, los factores externos (luz, temperatura, agua, fertilidad, salinidad del suelo, entre otros) pueden afectar significativamente algunos procesos asociados con el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluso en su capacidad para sintetizar MS, lo que conduce al cambio de sus perfiles fitoquímicos los cuales juegan un papel estratégico en la producción de sustancias bioactivas. En el mundo natural, la luz juega un papel irremplazable en la promoción del crecimiento de las plantas o como regulador del metabolismo. En respuesta a la radiación de luz, las plantas pueden adaptarse a los cambios de las circunstancias mediante la liberación y acumulación de varios MS (compuestos fenólicos, triterpenoides y flavonoides), los cuales tienen un alto valor económico debido a su importante propiedad antioxidante. En un experimento de fotoperíodo controlable, los análisis de composiciones químicas de *Vaccinium myrtillus* de las regiones del norte y del sur de Finlandia indicaron que los clones del sur produjeron un mayor contenido de antocianinas y sus derivados durante un período de 24 h, en comparación con un fotoperíodo más corto (12 h), el fotoperíodo más largo también aumentó el nivel de ácido clorogénico. En general, una luz solar de un largo día puede aumentar el nivel de MS en las plantas y respaldar aún más el papel de los flavonoides y los ácidos fenólicos en la protección de las plantas para resistir la exposición a la luz. Por otro lado, el estrés hídrico, puede regular el crecimiento morfológico, el desarrollo de las plantas, y alterar sus propiedades bioquímicas.

Varios estudios han demostrado que el estrés hídrico puede aumentar la cantidad de MS en una amplia variedad de especies de plantas. En *Pisum sativum* cv. Meteor, la concentración de flavonoides en las plantas que sufrieron sequía aumentó en un 45%, en comparación con las plantas control bien regadas. Otro ejemplo, que puede generar estrés en las plantas y por lo tanto, el aumento o disminución de los MS, son la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Se han

realizado una gran cantidad de experimentos sobre las deficiencias de nutrientes en las plantas, los niveles de nitrógeno tuvieron un impacto significativo en *Labisia pumila* Benth, a medida que se invirtió más nitrógeno de manera constante de 0 a 270 kg de N por ha⁻¹, se produjo una menor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides. El fertilizante en una proporción de N:P:K (1:0.6:1.2) puede reducir el contenido de flavonoides pero aumentar el contenido de polifenoles en *B. microphylla*. En otras palabras, los MS de la planta pueden generarse gradualmente en respuesta al estrés ambiental y, por lo tanto, en su capacidad de adaptación y supervivencia en respuesta a los estímulos ambientales durante la vida y sirven para establecer relaciones ecológicas entre plantas y otros organismos (Yang *et al.*, 2018).

Con base a que los extractos metanólicos de hojas de la planta silvestre y callos derivados de yemas apicales, presentaron perfiles cromatográficos con los mismos constituyentes, se decidió realizar la separación cromatográfica del extracto metanólico de callos por ser menos complejo, además de que no se observó la presencia de clorofilas, las cuales si estaban presentes en el extracto del árbol (Figura 18).

El extracto metanólico obtenido de biomasa de callo de yemas apicales de *T. americana* var. *mexicana* (21 g, 20.7%) se colectaron 99 alícuotas de 150 mL de cada una, a las cuales de acuerdo al perfil CCF, considerando los R_f y de las características observadas a través de la cámara de UV ($\lambda = 365$ nm) las alícuotas se reunieron en 29 fracciones denominadas F1 a F29 (Tabla 8).

Las fracciones F6, F15 y F23 (Tabla 8) se seleccionaron con base a sus perfiles cromatográficos de estar integradas por compuestos de baja, mediana y alta polaridad (Figura 20) para evaluar la actividad anti-inflamatoria y gastroprotectora en el modelo murino de inflamación inducida con TPA y de úlcera gástrica inducida con etanol, respectivamente.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 8. Fracciones obtenidas del extracto metanólico de biomasa de callo de yemas apicales de *Tilia americana* var. *mexicana*.

Sistema de elusión (Diclorometano:Metanol)	Alicuotas	Fracción	Sistema de elusión (Diclorometano:Metanol)	Alicuotas	Fracción
85:15	1	F1	85:15	41-46	F15
	2-5	F2		47-49	F16
	6-7	F3		50-51	F18
	8-10	F4		52-56	F19
	11-12	F5		57-61	F20
	13-15	F6	80:20	62-63	F21
	16-17	F7		64-66	F22
	18-20	F8		67-73	F23
	21-22	F9	70:30	74-81	F24
	23-25	F10		82-85	F25
	26-30	F11		86-88	F26
	31-35	F12		89-91	F27
	36-39	F13		92-97	F28
	40	F14		98-99	F29

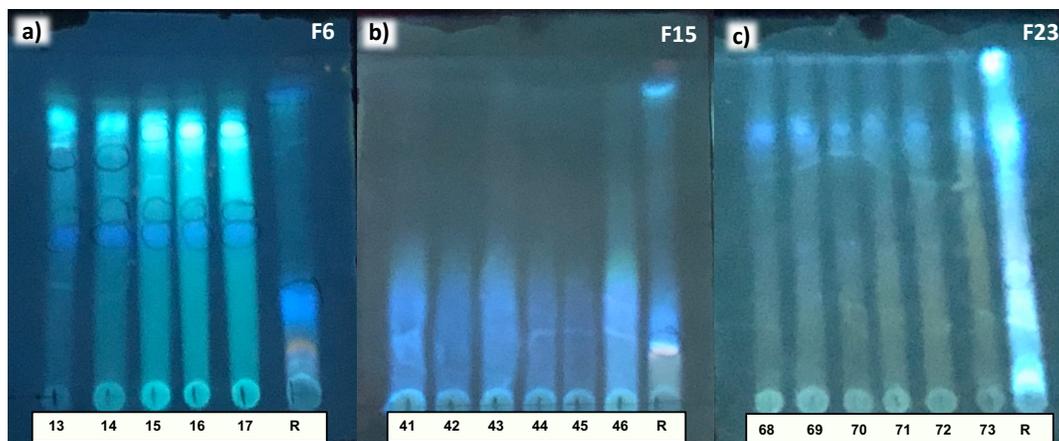


Figura 20. Perfil cromatográfico del extracto metanólico de biomasa de callo de yemas apicales de *Tilia americana* var. *mexicana*: a) F6, b) F15 y c) F23 en cromatoplasmas de sílica gel, sistema de elusión $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2, a) y (9:1, b y c), empleando el revelador 2-aminoacetil difenilborinato, y luz UV $\lambda = 365$ nm.

La fracción F15 fue la que presentó la mayor actividad gastroprotectora ($55.21\% \pm 3.60$) (Tabla 10). El cromatograma obtenido por HPLC muestra componentes mayoritarios con espectros de absorción característicos de cumarinas (Figura 21).

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la fracción F15 se observó la presencia de cuatro constituyentes mayoritarios: en el $t_r = 8.554$ min y espectro de absorción con longitudes de onda de máxima absorción de $\lambda = 221.6$ y 333.9 nm característicos de esculina, esculetina ($t_r = 8.706$ min y $\lambda = 212.2$ y 342.4 nm o en el $t_r = 9.063$ min y $\lambda = 194.6$ y 345.8 nm) y la presencia de otra cumarina en el $t_r = 9.248$ min y $\lambda = 208.7$ y 337.4 nm (Figura 21). Será necesario adquirir estándares comerciales de cumarinas como tomentina, fraxetina, escopolina, herniarina, daphnetina, entre otras. Además, se deberá purificar la fracción para su análisis por técnicas de RNM de ^1H y ^{13}C .

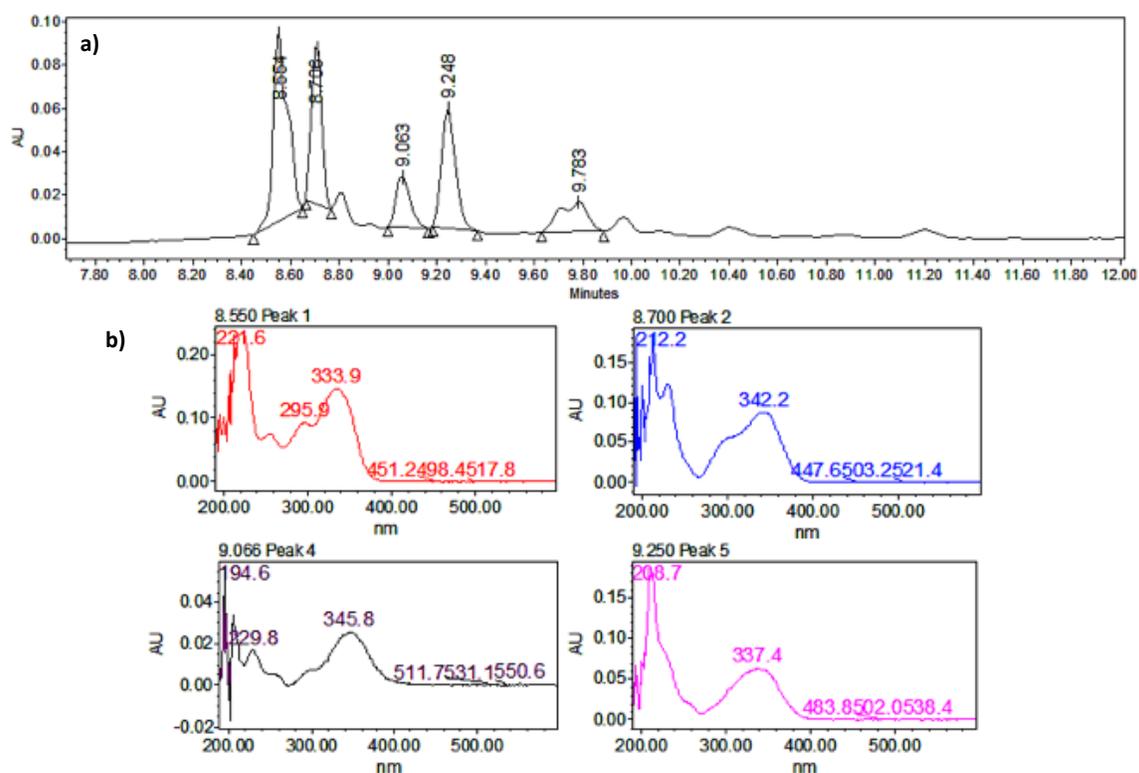


Figura 21. Cromatograma de HPLC (a) y espectros de absorción (b) de los constituyentes mayoritarios de la fracción F15 del extracto metanólico de biomasa de callo de yemas apicales de *Tilia americana* var *mexicana*.

La producción de metabolitos secundarios a través del cultivo de plantas en campo tiene varias desventajas por ejemplo: bajos rendimientos y fluctuaciones en las concentraciones debido a las variaciones geográficas, estacionales y ambientales. Por lo que el cultivo de tejidos vegetales, permite la obtención de cultivos de callos y células en suspensión como alternativas atractivas para la producción de

metabolitos secundarios (Ramachandra y Ravishankar, 2000). En este trabajo, la biomasa de callos de yemas apicales de *T. americana* var. *mexicana* obtenidos en el medio de cultivo MS con 0.005 mg/L de TDZ en combinación con 0.1 mg/L de AIB, podrían ser una alternativa para el desarrollo de células en suspensión para la producción de compuestos activos (Verpoorte *et al*, 2002; Murthy *et al*, 2014). Para ello, es necesario desarrollar estrategias que favorezcan el crecimiento y proliferación celular, así como la síntesis de compuestos secundarios la selección de estas líneas celulares es extremadamente importante. Algunas de estas estrategias son la optimización de los medios y entornos de cultivo, elicitación, precursores y nutrientes del medio de cultivo, permeabilización, la inmovilización y métodos de biotransformación (Murthy *et al.*, 2014).

La selección de líneas celulares se puede realizar mediante la visualización, si el producto es un pigmento, por ejemplo en la producción de antocianinas en *Euphorbia millii* y *Daucus carota*. En la actualidad, se utilizan técnicas modernas de cuantificación como la espectrofotometría UV-Vis, CCF, HPTCL, HPLC y RMN, las cuales proporcionan información cuantitativa sobre las células, órganos y metabolitos secundarios en condiciones *in vitro* de cultivo (Pasqua *et al.*, 2003; Murthy *et al.*, 2014).

7.6 Edema Auricular inducido con TPA

El empleo de TPA como agente inflamatorio, tiene la ventaja en el estudio de productos naturales, porque utiliza pequeñas cantidades de muestra, involucra respuesta local de la piel de la oreja de ratón, evitando interferencias con la excreción y metabolismo del extracto, fracción o compuesto evaluado. Las pequeñas dosis empleadas en este modelo son suficientes y semejantes a los producidos por la administración oral de un fármaco convencional a dosis más elevadas (Jurupe *et al.*, 1995). La actividad anti-inflamatoria de los extractos metanólicos de hojas de la planta silvestre, biomasa de callo de yemas apicales y las fracciones F6, F15 y F23, se evaluaron en el modelo de edema auricular inducido con TPA (Patel y Gowda, 2012). El grupo control negativo presentó el máximo nivel de inflamación (10.31 mg) después de 4 h de administrado el TPA considerado

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

como el 100% de respuesta inflamatoria (Tabla 9). El extracto metanólico de hojas de la planta silvestre a la dosis de 0.125 mg/oreja presentó un peso de la oreja similar al control negativo (10.38 ± 0.15 mg), mientras que el control positivo, el extracto metanólico de biomasa de callo y las fracciones fueron más bajos que el obtenido en el control negativo ($F_{0.005} = 6.01$, $p = 0.0061$, $Tukey_{0.005} = 2.59$).

Tabla 9. Efecto de los extractos metanólicos de hojas, callos y fracciones de *Tilia americana* var. *mexicana* en el modelo de edema auricular inducido con TPA.

Tratamiento	Dosis (mg/Oreja)	Peso de la oreja (mg)	Inhibición del edema (%)
TPA	----	10.31 ± 0.68	----
Indometacina	0.50	3.46 ± 0.34	65.23 ± 3.42
Extracto metanólico de hojas de la planta silvestre	0.125 0.25 0.50 0.75	10.38 ± 0.15 7.52 ± 0.90 4.23 ± 0.55 1.70 ± 0.89	5.50 ± 1.99 32.84 ± 8.17 57.45 ± 5.49 82.91 ± 8.92
Extracto metanólico de callo de yemas apicales	1.00 1.50 1.75 2.00	9.30 ± 0.21 7.90 ± 0.48 5.58 ± 0.34 3.28 ± 0.38	12.85 ± 1.93 28.16 ± 4.62 47.71 ± 3.14 70.15 ± 1.60
Fracciones metanólicas de callo de yemas apicales			
F6		9.1 ± 0.1	14.15 ± 0.91
F15	1.00	7.9 ± 0.1	$27.23 \pm 1.44^{**}$
F23		8.75 ± 0.13	$21.41 \pm 2.46^*$

Promedio \pm desviación estándar (n=5)

El control positivo inhibió la formación del edema a un $65.23\% \pm 3.42$. El extracto metanólico de hojas de la planta silvestre a una dosis de 0.50 mg/oreja presentó inhibición del edema ($57.45\% \pm 5.49$) similar a la indometacina, mientras que en el extracto de biomasa de callo a la dosis más alta (2.00 mg/oreja). El extracto

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

metanólico de hoja de la planta silvestre y de biomasa de callo presentaron un efecto dosis dependiente con una $DE_{50} = 0.38$ y 1.73 mg/oreja respectivamente (Figura 22).

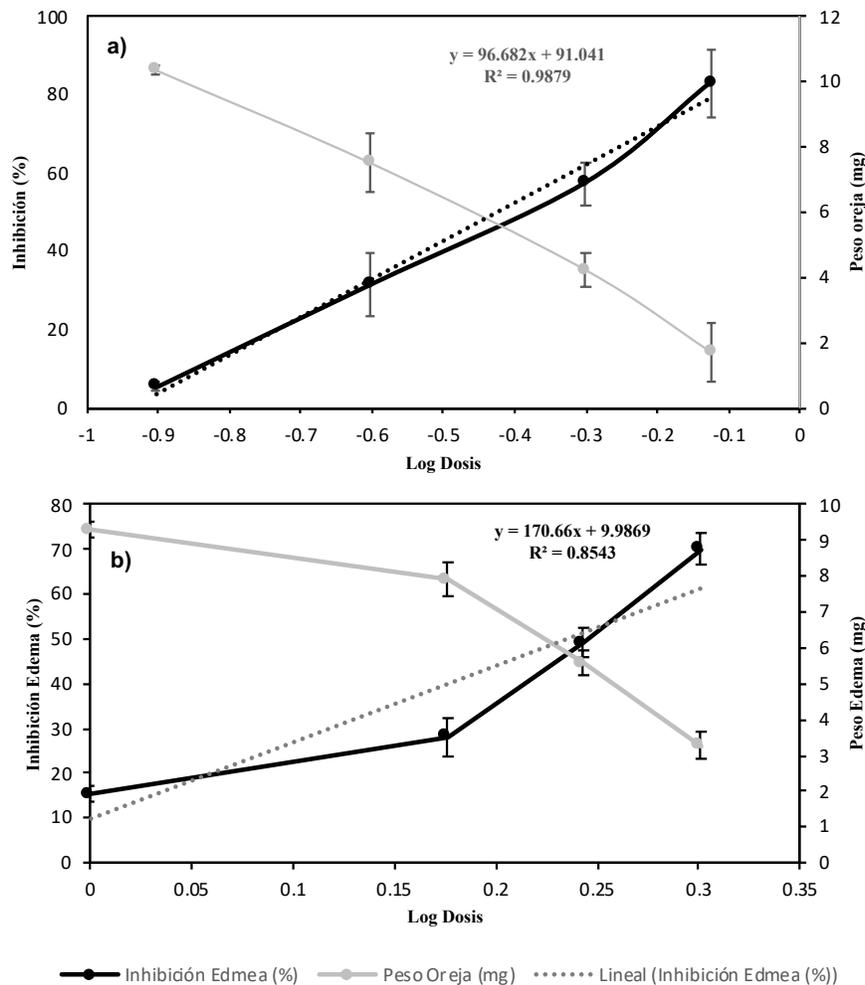


Figura 22. Relación entre la dosis de los extractos metanólicos de las hojas (a) y callos (b) de *Tilia americana* var. *mexicana* y el porcentaje de inhibición del edema auricular; y entre las dosis y el peso del edema auricular inducido con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA). La línea de ajuste fue generada por regresión lineal ($n = 5$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.

En todo el mundo, las especies de *Tilia* se han utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades tranquilizantes y sedativas, las hojas y flores se han utilizado como remedio para tratar la inflamación y el dolor artrítico, padecimientos asociadas con el dolor como los colicos nefríticos, hemorroides, enterocolitis, gastroenteritis, dolor menstrual y el de cabeza (Aguirre *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2009; Angeles

et al., 2013; Aguirre *et al.*, 2016). Sin embargo, no se han realizado estudios científicos que demuestren su efecto anti-inflamatorio. En este trabajo se demostró la actividad anti-inflamatoria de los extractos metanólicos y fracciones primarias obtenidos de hojas de la planta silvestre y de biomasa de callo de yemas apicales de *T. americana* var. *mexicana*.

En el extracto metanólico de hojas de la planta silvestre de *T. americana* var. *mexicana* se puede observar en el cromatograma (Figura 18a), picos que se observan entre los tiempos 8.0-8.8 min, los cuales presentan una altura considerable (0.14 AU), la cual está relacionada con su contenido, mientras que en el extracto metanólico de biomasa de callo se observan estos mismos picos pero con una altura pequeña (0.02 AU) (Figura 18c), estos picos pueden ser compuestos del tipo de cumarinas y/o flavonoides, que al estar más altos en el extracto del árbol estará generando un mejor efecto anti-inflamatorio (Tabla 9). Diversos estudios han reportado y sustentado la importancia de las cumarinas y/o flavonoides en muchas actividades biológicas entre ellas anti-inflamatorias y antioxidantes, reportes de los cuales se hablará más adelante (Sumbul *et al.*, 2011; Grover y Sanjay, 2015).

Los porcentajes de inhibición del edema observado en las fracciones derivadas del extracto de biomasa de callo fueron estadísticamente diferentes ($F_{0.005} = 8.99$, $p = 0.0041$, $Tukey_{0.005} = 3.77$), la fracción F15 fue la más activa seguida de la fracción F23 (Tabla 9).

La agresión de cualquier agente físico, químico o microbiológico, puede desencadenar un proceso inflamatorio (García *et al.*, 2000). El modelo de edema auricular inducido por TPA es ampliamente utilizado para evaluar la actividad anti-inflamatoria de extractos, fracciones y compuestos puros, obtenidos de productos naturales. La aplicación tópica del TPA en la oreja del ratón induce una inflamación aguda, esto se debe a la activación de la PKC dérmica, proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y PLA₂, la sobreproducción de mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1, IL6 y COX-2, así como de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las cuales provocan estrés oxidante, amplificando el daño cutáneo inducido por TPA. Esta cascada estimula la vascularización, permeabilidad, vasodilatación, liberación de histamina y serotonina; síntesis moderada de

eicosanoides por la enzima LOX y prostaglandinas por la enzima COX (Patel y Gowda, 2012).

En los resultados obtenidos se observa una disminución del proceso inflamatorio agudo de forma significativa en la lesión tópica inducida con TPA, debido a la presencia de cumarinas presentes en los extractos metanólicos, así como en la fracción más activa (F15). El análisis de HPLC realizado a los extractos permitió observar la presencia y cuantificación de escopoletina. En este trabajo de investigación fue posible identificar la presencia de cumarinas, sin embargo, es necesario realizar estudios fitoquímicos y de resonancia magnética nuclear para la identificación de los otros componentes presentes en la fracción 15 y determinar su mecanismo de acción.

Las cumarinas tienen una amplia gama de actividades biológicas como son antimicrobianas, antivirales, anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes y anticoagulantes (Grover y Sanjay, 2015). La literatura reporta que estas ejercen una acción antiinflamatoria a través de diversos mecanismos como la inhibición de las enzimas COX y LOX, reduciendo la formación de edema al estimular la fagocitosis y la inhibición de la enzima inducible óxido nítrico sintasa (iNOS). Ensayos recientes se reportan también la actividad antiinflamatoria y antioxidante de la escopoletina, fraxetina, esculina y dapnetina (Grover y Sanjay, 2015). La esculina inhibe a la LOX (0.65 μM) a través de un mecanismo no-competitivo; la actividad inhibitoria de la esculina a la misma enzima de forma más débil (290 μM) comparada con la esculina (Fylaktakidou *et al.*, 2004).

La escopoletina se ha aislado de varias especies de plantas, y estudios científicos han reportado sus propiedades antiinflamatorias y antiartríticas. En estudios realizados con ratones se ha reportado que la escopoletina inhibe la biosíntesis de eicosanoides, el flujo celular y la peroxidación, tiene un efecto hipouricémico inmediato y dependiente de la dosis vía intraperitoneal en ratones hiperuricémicos (Pan *et al.*, 2009).

El extracto de diclorometano de las partes aéreas de *Solanum ligustrinum*, se evaluó en el modelo de edema subplantar inducida con carragenina, dicho extracto mostró el 16% de actividad antiinflamatoria, y la fracción rica en escopoletina presentó el

65% del efecto antiinflamatorio a una dosis de 50 mg/kg, teniendo un efecto similar a la del naproxeno sódico de 54.6% a una dosis de 4 mg/kg (Fylaktakidou *et al.*, 2004). Se evaluó el efecto de los extractos de diclorometano obtenidos de biomasa y los medios de cultivo de suspensiones celulares de *Spharalcea angustifolia* cultivadas en medios MS reducidos en nitratos para incrementar la producción de compuestos activos (escopoletina, ácido sphaerálcico y tomentina). El extracto diclorometano del medio de cultivo y la biomasa de suspensiones celulares (2.74 mM de nitrato) presentaron la inhibición del edema subplantar inducida con λ -carragenina a las 5 h de la administración i.p (42 y 39% respectivamente) comparado con el extracto de diclorometano de la planta silvestre (12%) (Nicasio-Torres *et al.*, 2016).

7.7 Úlcera gástrica inducida con etanol

La patología de una úlcera gástrica es compleja y afecta a muchas personas en todo el mundo, su desarrollo se debe principalmente a un desequilibrio entre los factores agresivos y protectores de la mucosa gástrica (Sumbul *et al.*, 2011). En este estudio, se evaluaron los extractos metanólicos de hojas de planta silvestre, biomasa de callo de yemas apicales y las fracciones F6, F15 y F23 de *T. americana* var. *mexicana*, en el modelo murino de úlceras gástricas inducida con etanol (Saini *et al.*, 2012).

En la Figura 23, se presentan los resultados del estudio de la actividad gastroprotectora de los extractos y las fracciones de *T. americana* var. *mexicana*. Las úlceras se desarrollaron principalmente en la parte superior y parte media del cuerpo gástrico del estómago en todos los tratamientos evaluados (Figura 23a-g). En el control negativo se observó un daño gástrico marcado (Figura 23a), caracterizado por la formación de úlceras por el contacto directo con un agente necrotizante como el etanol. Con la famotidina se obtuvo un porcentaje de protección bajo (Figura 23b), posiblemente debido a la dosis administrada. La famotidina inhibe la acción de la histamina sobre el receptor H₂ de la célula parietal gástrica y de esta forma inhibe la producción de ácido clorhídrico. En estudios recientes, a dosis de 40 mg/día (doble de lo recomendado), la famotidina previno la

formación de lesiones, tanto gástricas como duodenales, generadas por la administración de fármacos AINEs (Bonet *et al.*, 2002).

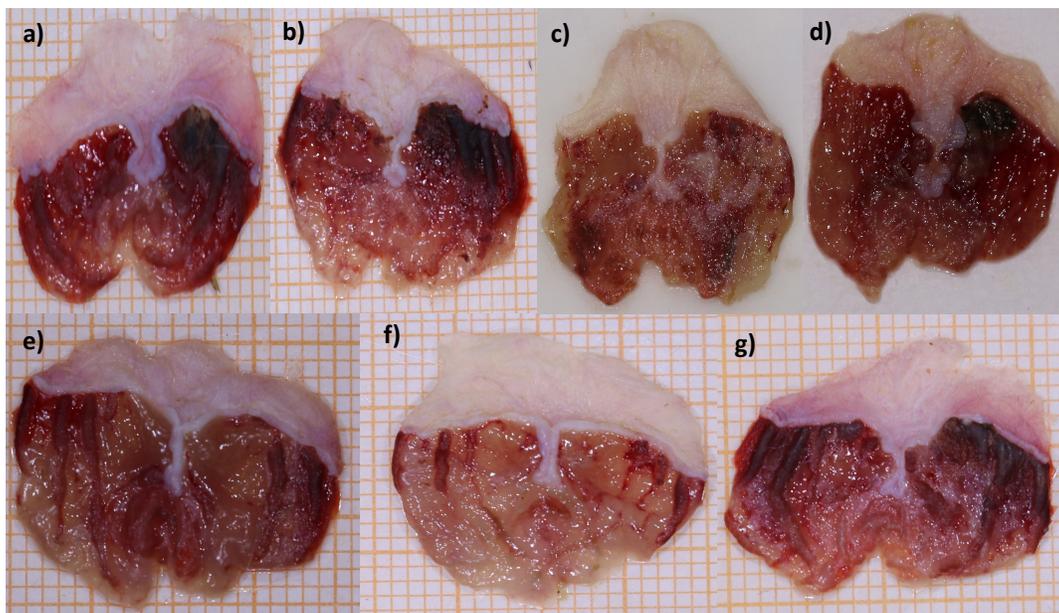


Figura 23. Estómagos de ratones con úlcera gástrica inducida con etanol: a) Tween 20 al 1%, b) Famotidina a 20 mg/kg, extractos metanólicos a 100 mg/kg de: c) hojas de la planta, d) biomasa de callo y fracciones a 10 mg/kg: e) F6, f) F15 y g) F23 de *T. americana* var. *mexicana*.

El control negativo presentó un porcentaje de ulceración de $74.05\% \pm 4.88$. La famotidina a la dosis de 20 mg/kg no disminuyó significativamente las lesiones gástricas (Tabla 10). Los extractos metanólicos de hojas de la planta silvestre y la biomasa de callo de yemas apicales no presentaron un efecto gastroprotector ($F_{0.005} = 12.25$, $p = 0.002$, $Tukey_{0.05} = 2.59$) a una dosis de 100 mg/kg (Tabla 10). El análisis estadístico determinó diferencias significativas entre su efecto gastroprotector, la fracción más activa fue la F15 ($55.21\% \pm 3.60$) ($F_{0.005} = 6.52$, $p = 0.0121$, $Tukey_{0.005} = 3.77$), seguida de la fracción F6 ($37.27\% \pm 2.40$) ($p < 0.05$) a una dosis de 10 mg/kg (Tabla 10).

En la medicina tradicional las plantas medicinales representan un recurso valioso para el hombre desde la época prehispánica. Su uso se asocia principalmente a las comunidades indígenas que radican en zonas rurales, sin embargo, en lugares urbanizados dentro de nuestra vida cotidiana seguimos recurriendo a estas plantas para el alivio de algún dolor o malestar. En los últimos años, se ha presentado un

resurgimiento en el uso de productos naturales, ya que este tipo de plantas son fuente directa de agentes terapéuticos, que se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos, además, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas (Ortiz, *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de contar con ésta amplia riqueza farmacológica, numerosas propiedades curativas son aun desconocidas, lo que refleja la necesidad de realizar estudios detallados de ellas, tomando en cuenta métodos científicos integrales (Urióstegui, 2015).

Tabla 10. Efecto gastroprotector de los extractos metanólicos de hojas, callos y fracciones de *Tilia americana* var. *mexicana* en el modelo de úlcera gástrica inducida con etanol.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	% Ulceración	% Protección
Tween 20 al 1%	----	74.05±4.88	----
Famotidina	20.0	52.10±1.17	29.63±1.60
Extracto metanólico de hojas de la planta silvestre	100	47.90±8.50	35.31±11.48
Extracto metanólico de callo de yemas apicales	100	51.94±4.68	29.85±6.32
Fracciones metanólicas de callo de yemas apicales			
F6		62.17±1.77	37.27±2.40*
F15	10.0	36.56±3.61	55.21±3.60**
F23		71.82±0.44	10.98±0.60

Promedio±desviación estándar (n = 6)

Como se describió anteriormente, en la fracción más activa se identificaron compuestos mayoritarios del tipo de las cumarinas de entre ellas escopoletina y esculina (Figura 21). Las cumarinas poseen amplios efectos biológicos, se sabe que actúan en el tracto gastrointestinal, presentan propiedades antiespasmódicas, antisecretoras y antioxidantes (Sumbul *et al.*, 2011; Venugopala *et al.*, 2013; Rohini y Srikumar, 2014; Grover y Sanjay, 2015; Matos *et al.*, 2015).

La actividad antioxidante de las cumarinas se relaciona por atrapar y eliminar radicales libres como el superóxido, hidroxilo, peróxido y alcoxilo. De esta manera, son capaces de prevenir la formación de lesiones inducidas por diferentes agentes (Bucciarelli *et al.*, 2017). Estudios científicos reportan que la rutina, quercetina y el canferol tienen efectos protectores contra la úlcera gástrica inducida con etanol al disminuir el estrés oxidante y aumentar la actividad enzimática antioxidante. Además, se sabe que algunos flavonoides interfieren en el proceso de inflamación y aumentan el contenido de moco en la mucosa gástrica, lo que produce efectos citoprotectores (Augusti *et al.*, 2014) e inhiben el crecimiento de *Helicobacter pylori* (Sumbul *et al.*, 2011).

Se estudió la actividad gastroprotectora del extracto metanólico de hojas de *Alchornea glandulosa*, inducida con HCl/etanol y fármacos AINEs en ratas, el extracto disminuyó significativamente la secreción de ácido gástrico. El estudio fitoquímico de *A. glandulosa* permitió aislar los compuestos fenólicos 3-O- α -L-ramnopiranosido de miricetina, 3-O- α -L-arabinopiranosido de quercetina, 3-O- β -D-galactopiranosido de quercetina, quercetina, amentoflavona, galato de metilo, ácido gálico y pteroginidina. La administración oral de extractos clorofórmico, metanólico e hidrometanólico de hojas de *Byrsonima crassa* redujeron significativamente la formación de lesiones inducidas con HCl/etanol en un modelo murino. La evaluación química de los extractos mostró la presencia de 3-O- β -D-galactopiranosido de quercetina, 3-O- α -L-arabinopiranosido de quercetina, amentoflavona biflavonoide, (+)-catequina y (-)-epicatequina. Las plantas que contienen metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos (flavonoides y cumarinas) previenen la formación de las úlceras gástricas debido a sus propiedades antioxidantes (Sumbul *et al.*, 2011). Numerosos estudios experimentales sugieren que el etanol causa daños severos a la mucosa gastrointestinal, comenzando con lesiones microvasculares, aumento de la permeabilidad vascular, formación de edema y levantamiento epitelial. Produciendo una fuerte vasoconstricción que es acompañada de una rápida y vigorosa dilatación arteriolar, disminuye la secreción de HCO_3^- , la producción de moco, se activa el TNF- α y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK)

(Kaur *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2012; Amaral *et al.*, 2013; Buenor *et al.*, 2013; Augusti *et al.*, 2014). Además, se sabe que el etanol genera especie ROS como aniones superóxido, radicales hidroxilo y peróxidos lipídicos (Augusti *et al.*, 2014); durante los episodios mencionados de isquemia-reperusión, hay un incremento de la peroxidación lipídica y los ROS provocan severos cambios a nivel celular, conduciendo a la muerte de las células gástricas ya que, atacan constituyentes celulares esenciales como ácidos nucleicos, proteínas o lípidos, causan exfoliación y erosión epitelial, formando compuestos tóxicos como epóxidos, aldehídos y nuevos radicales radicales libres (Kaur *et al.*, 2012; Bucciarelli *et al.*, 2017). Las células gástricas contienen varias agentes enzimáticos antioxidantes como son la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión endogeno, grupos sulfhidrilo, entre otros, sin embargo, la generación excesiva de las especies ROS incrementa la peroxidación lipídica y agota la actividad de estas enzimas antioxidantes (Augusti *et al.*, 2014).

Estos hallazgos son importantes ya que esto podría explicar la actividad gastroprotectora de los extractos y de la fracción más activa de *T. americana* var. *mexicana*. Además, los resultados obtenidos hasta el momento podrían sustentar el uso tradicional de *T. americana* var. *mexicana* en trastornos digestivos, como una terapia de prevención y recuperación en la enfermedad de la úlcera gástrica.

8. Conclusiones

- ❖ El empleo de Radix 10, 000[®] ppm de AIB permitió el desarrollo de raíces en esquejes de *T. americana* var. *mexicana* colectados en otoño (mes de septiembre).
- ❖ Es el primer trabajo en el que se reporta la obtención de plantas completas a partir del enraizamiento de esquejes de *T. americana* var. *mexicana*.
- ❖ El 60% de los esquejes de *T. americana* var. *mexicana* desarrollaron brotes a los 8 días de cultivo, los cuales se utilizaron como fuentes de explantes.
- ❖ La desinfección con 0.5% de extran durante 5 min y 0.7% de NaOCl durante 15 min, fue eficiente para el control de la contaminación y baja oxidación de los explantes de yemas apicales y axilares de *T. americana* var. *mexicana*.
- ❖ El 75% yemas apicales de *T. americana* var. *mexicana* cultivadas en medio MS suplementado con BA/ANA (2.0/0.25 mg/L) formaron en promedio 3 brotes/explante en a los 90 días de cultivo.
- ❖ El 60% de las yemas axilares de *T. americana* var. *mexicana* cultivadas en el medio MS suplementado con BA/ANA (0.5/0.25 mg/L) formaron en promedio de 3 brotes/explante a los 90 días de cultivo.
- ❖ El desarrollo de callogénesis estuvo influenciado por la combinación hormonal empleada en los medios de cultivo (BA/ANA, TDZ/AIB) y no por su concentración.
- ❖ Las yemas apicales de *T. americana* var. *mexicana* cultivadas en medio MS complementado con diferentes concentraciones de TDZ estimularon la formación de callos.
- ❖ En las yemas axilares de *T. americana* var. *mexicana*, la mayor inducción de callogénesis (80%) se generó en el medio MS suplementado con TDZ/AIB (0.20/0.1 mg/L) a los 90 días de cultivo.
- ❖ Lo callos derivados del tratamiento hormonal TDZ/AIB (0.005/0.1 mg/L) fueron friables y capaces de sintetizar los compuestos con actividad ansiolítica: 3-β-D-glucósido de quercetina (115.86 μg/g biomasa) y tilirósido (88.24 μg/g biomasa) y actividad antiinflamatoria: escopoletina (7.64 μg/g biomasa).

- ❖ La evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de hojas de la planta silvestre *T. americana* var. *mexicana*, en el modelo de edema auricular inducido con TPA permitió corroborar su uso en la medicina tradicional.
- ❖ Los extractos metanólicos de hojas de la planta silvestre y de biomasa de callo de yemas apicales de *T. americana* var. *mexicana*, presentaron un efecto antiinflamatorio dependiente de la dosis con una $DE_{50} = 0.38$ y 1.73 mg/oreja, respectivamente.
- ❖ La actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos de hojas de la planta silvestre y biomasa de callo de yemas apicales se atribuye a la presencia de escopoletina.
- ❖ Los extractos metanólicos de hojas y callos de *T. americana* var. *mexicana* a la dosis de 100 mg/kg presentaron un efecto gastroprotector en el modelo de úlceras inducidas con etanol.
- ❖ La fracción F15 fue la más activa como antiinflamatorio y gastroprotector, efectos atribuidos a la presencia de cumarinas (escopolina y esculina entre otras), principales constituyentes en dicha fracción.
- ❖ Este es uno de los primeros trabajos científicos en el que se reporte la actividad antiinflamatoria y gastroportectora de extractos de hojas de la planta y biomasa de callo de yemas apicales de *T. americana* var. *mexicana*.

9. Perspectivas

- ❖ Continuar con el proceso de micropropagación a través del enraizamiento de los brotes generados *in vitro* de *Tilia americana* var. *mexicana* y realizar el proceso de aclimatización en invernadero y medio ambiente.
- ❖ Establecer el cultivo de células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana* en el medio de cultivo Murashige y Skoog y caracterizar el crecimiento y producción de compuestos activos; así como evaluar estrategias de estimulación para incrementar la producción para hacer redituable el proceso biotecnológico.
- ❖ Evaluar otras frecuencias y tiempos de inmersión en los sistemas RITA® que permitan la obtención de brotes múltiples en explantes de yemas apicales y axilares de *Tilia americana* var. *mexicana*.
- ❖ Identificar otros compuestos con actividad antiinflamatoria y gastroprotectora producidos en los callos y células en suspensión de *Tilia americana* var. *mexicana*.
- ❖ Realizar estudios que permitan determinar el mecanismo de acción de la fracción más activa (F15) proveniente del extracto metanólico de callos de *Tilia americana* var. *mexicana*.

10. Referencias bibliográficas

- ❖ Aguirre HE, González TMA, Martínez AL, 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* var. *mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*. 127:91-97.
- ❖ Aguirre HE, González TME, Terrazas T, Herrera SJ y Guevara FP. (2016). Anxiolytic and sedative-like effects of flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*: GaBAergic and serotonergic participation. *Salud mental*. 39(1): 37-46 pp. Doi: 10.17711/SM.0185-3325.2015.066.
- ❖ Aguirre HE, Martínez AL, González TME, Moreno J, Vibrans H y Soto HM. (2007). Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 109(1): 140-145 pp. Doi: 10.1016/j.jep.2006.07.017.
- ❖ Albarracín MH. (s.f.) Modulo de trabajo: métodos biotecnológicos. Moquegua, PE. 73 p.
- ❖ Alva BD, Avalos RS, Jara RM, Palacios BE, Quispe VA, Ramírez EF, Ramírez SJ, Reyes PM, Rodríguez TG y Guevara VA. (2015). Efecto de extracto acuoso de fruto de *Capsicum pubescens* en úlceras gástricas inducidas en *Rattus* var. *albinus*. *Revista Farmaciencia*. 03(1): 31-38 pp.
- ❖ Amaral GP, de Carvalho NR, Barcelos RP, Dobrachinski F, Portella RD, da Silva MH, Lugokenski TH, Dias GR, da Luz SC y Boligon AA. (2013). Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induce by ethanol in rats. *Food and chemical toxicology*. 55: 48-55 pp. Doi: 10.1016/j.fct. 2012.12.038
- ❖ Ángel MJX y González CJJ. (2013). Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad golden. Tesis para ing. agrónomo. Universidad de el Salvador Centro America. 8-9 pp.
- ❖ Angeles LGE, González TE, Déciga CM y Ventura MR. (2013). Neuroprotective evaluation of *Tilia americana* and *Annona diversifolia* in the neuronal damage induced by intestinal isquemia. *Neurochem Res*. 38(8): 1632-1640 pp. Doi: 10.1007/s11064-013-1065-5
- ❖ Aranguren RI, Elizondo RG y Azparren AA. (2016). Consideraciones de seguridad de los AINE. Bolétin de información farmacoterapéutica de Navarra. 24(2): 1- 12 pp.
- ❖ Armita S, Nidhi S y Ramica S. (2012). Animal models to evaluate the cause behind gastric ulcers. *International research journal of pharmacy*. 3(8): 34-38 pp.
- ❖ Arroyo J, Bonilla P, Moreno EL, Roncero G, Tomás G, Huamán J, Ruez E, Quino M y Rodríguez CJ. (2013). Efecto gastroprotector y antisecretor de un fitofármaco de hojas de Matico (*Piper aduncum*). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 30(4): 608-615 pp.
- ❖ Augusti BA, Borba FR, Faccim BT, Pansera WE, Vargas KC, Silva AD, Linde AM y Freitas BL. (2014). Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 4(5): 358-367 pp.
- ❖ Avilés MD. (2008). Efecto antidepresivo y caracterización química de extractos de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de *Tilia americana* var. *mexicana*. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, Morelos. Tesis de maestría. 28-29, 38-39 pp.
- ❖ Ayala GLM. (2010). Inducción de embriogénesis somática en cultivo *in vitro* de *Agave atrovirens* Karw. Ex Saldyck. Instituto politécnico nacional, Centro de Investigación en biotecnología aplicada. Tlaxcala, Tlaxcala. Tesis de maestría 20-25 pp.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Azofeifa A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-175 pp. Doi: 10.15517/am.v20i1.4990.
- ❖ Batlouni M. (2010). Antiinflamatorios no esteroides: efectos cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. *Revista Arq Bras Cardiol*. 94(4): 538-546 pp.
- ❖ Bellucci SAP. (2002). La herbolaria en los mercados tradicionales. [Versión electrónica]. *Revista del Centro de Investigación México*. Universidad La Salle. 5(17-18):63-70.
- ❖ Bidwell RS. (1983). Fisiología vegetal. A.G.T. Editor S.A México D.F, 409-438 pp.
- ❖ Biodiversidad en México, un reto para la conservación. (2010). Consultado el 01 de Septiembre de 2015, <http://www.mexicodesconosido.com.mx/biodiversidad-en-mexico-un-reto-para-la-conservacion.html>.
- ❖ Bogado FA, Vera BC, Ayala PG, Sansberro PA, y Luna CV. (2016). Uso de distintos desinfectantes superficiales para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Grevillea robusta*. Universidad Nacional de Rosario. *Ciencia Agronómica*. 16(27): 11-16 pp.
- ❖ Boligon AA, Machado MM y Athayde ML. (2014). Technical evaluation of antioxidante activity. *Med Chem*. 4: 517-522 pp.
- ❖ Bonet JT, Egea AM, & Herola AG. (2002). Úlcera gástrica y duodenal. *Guía de Actuación Clínica en AP [Internet]*. Recuperado el 13 de Septiembre de 2019, www.san.gva.es/documents/246922/251004/guiasap035ulcera.pdf. 1-29 pp.
- ❖ Brands SJ. The Taxonomicom. (2009) Universal Taxonomic Services, Amsterdam, The Netherlands. Recuperado de: <http://taxonomican.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=6323&tree=0.1>.
- ❖ Bucciarelli A, Lofiego A, Bensack I, Rihl C y Skliar M. (2017). Gastroprotective activity of *Araujia sericifera* Brot. var. *hortorum* (E. Fourn), a south american plant species of medicinal use. *Rev. de la asociación médica de Bahía Blanca*. 27(1): 30-36 pp.
- ❖ Buenor AM, Anseh C, Galyuon I y Nyarko A. (2013). *In vivo* models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agents. *Ulcers*. 2013, ID 796405, 12 pps. Doi: [org/10.1155/2013/796405](http://dx.doi.org/10.1155/2013/796405)
- ❖ Busse WW y Gaddy JN. (1991). The role of leujotriene antagonists and inhibitors in the treatment of airway disease. *Am Rev Respir Dis*. 143(Suppl): 103-107 pp.
- ❖ Cabrera JM y González JE. (2016). Ozone as an alternative for disinfection of explants during *in vitro* mass plant propagation. *Ozone: Science & Engineering*. 36: 435-439 pp. Doi: 10.1080/01919512.2013.874940.
- ❖ Calderón ZE. (2005). II Curso básico de multiplicación de plantas. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa. 23-25 pp.
- ❖ Calva CG y Pérez VJ. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*. 6(1): 1-16 pp. ISSN: 1067-6079.
- ❖ Camacho MJE. (2014). Úlcera péptica. *Revista medica de costa rica y centroamerica*. 609: 129-134 pp.
- ❖ Cantú SM, Jin LH, Donodo A, Puyó AM y Peredo HA. (2017). El ácido araquidónico y sus derivados. Generalidades de los prostanoïdes en relación con procesos inflamatorios. *Ciencia e investigación*. 67(4): 1-12 pp.
- ❖ Chalupa V. (1987). Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill, *Sorbus aucuparia* L and *Robinia pseudoacacia* L. *Biologia plantarum*. 29(6): 425-429 pp.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Chalupa V. (2003). *In vitro* propagation of *Tilia platyphyllos* by axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. *Journal of forest science*. 49(12): 537-543 pp.
- ❖ Chamorro AH, Martínez SL, Fernández JC y Mosquera T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Limonium* var. *Misty blue*. *Agronomía Colombiana*. 25(1): 47-53 pp.
- ❖ Choyillas T. (2000). Inflamación aguda y crónica. *Patología estructural y Funcional*. C. Ranz, Editor. McGraw-Hill.
- ❖ Cienfuegos A. (2010). Serie de la fisiología a la clínica. Secreción gástrica e inhibidores de bomba de protones. *Rev Colombiana de Gastroenterología, endoscopia digestiva, coloproctología y Hepatología*. 25(1): 94-98 pp.
- ❖ Cisneros-Torres D, Cruz-Sosa F, González-Cortazar M, Martínez-Trujillo A y Nicasio-Torres P. (2019). 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 concentration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 139(2): 305-316 pp
- ❖ Conabio. *Programa de Especies Invasoras de México*. México. (2005). Consultado el 02 de Septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info.Especies.invasoras/doctos/especiesinvasoras.html>
- ❖ Cuidar la biodiversidad en México: un tema urgente. (2014). Consultado el 01 de Septiembre de 2015, disponible en: <http://noticias.universia.net.mx/ciencia-nn-tt/noticia/2014/05/23/1097363/cuidar-biodiversidad-mexico-tema-urgente.html>.
- ❖ Dubos CR. (2006). Establecimiento *in vitro* de diferentes especies y genotipos del género *Rhododendron* mediante el uso de técnicas de micropropagación. Universidad austral de Chile. Facultad de Ciencias agrarias, Escuela de Agronomía. Tesis de Lic. en Agronomía. Valdivia, Chile. 3-8 pp. (86 pp totales).
- ❖ Escalona CLJ, Tase AA, Estrada MA y Almaguer MML. (2015). Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo Arriba. Guisa, Granma. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 20(4): 429-439.
- ❖ Etienne H y Berthouly M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 69(3): 215-231 pp.
- ❖ Figuereido AC, Barroso JG, Pedro JG y Scheffer JJC. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 23: 213-226 pp. Doi: 10.1001/ffj.1875
- ❖ Franco LA, Matiz GE, Calle J, Pinzón R y Ospina LF. (2007). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Biomédica*. 27: 110-115 pp.
- ❖ Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE y Nicolaides DN. (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Current pharmaceutical desing*. 10(30): 3813-3833 pp.
- ❖ García BP. (2008). Inflamación. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.fis.Nat. IX Programa de promoción de la cultura científica y tecnológica*. 102(1): 91-159 pp.
- ❖ García de Alba GJE, Ramírez Hernández BC, Robles AG, Zañudo HJ, Salcedo RAL y García de Alba VJE. (2011). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*. 39: 29-44.
- ❖ García de Lorenzo y MA, López MJ y Sánchez CM. (2000). Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina Intensiva*. 24(8): 353-360 pp.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ García LDL, Mesa LN y Ocampo GML. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 8(2): 76-84 pp. Doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277.
- ❖ George E y Sherrington P. (1984). Plant propagation by tissue culture. Eversley, Inglaterra. Exegetics. 709 p.
- ❖ George EF y Debergh PC. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. En: Plant Propagation by Tissue Culture. Springer, Netherlands. 29-64 pp.
- ❖ Grover J y Sanjay MJ. (2015). Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development. *Royal Society of Chemistry.* 5; 38892-38905 pp.
- ❖ Guilfoyle T, Hagen G, Ulmasov T y Murfett J. (1998). How does auxin turn on genes?. *Plant physiol.* 118: 341-347 pp.
- ❖ Gutiérrez AM. (2015). Optimización del crecimiento de la suspensión celular de *Tilia americana* variedad mexicana y obtención de compuestos antiinflamatorios. Instituto Tecnológico de Zacatepec. Tesis Licenciatura. Zacatepec de Hidalgo, Morelos. 79 pp.
- ❖ Gutiérrez CB. (1995). Consideraciones sobre la fisiología y el estado de madurez en el enraizamiento de estacas de especies forestales. *Ciencia e investigación forestal-Instituto Forestal.* 9(2): 261-277 pp.
- ❖ Hartman H, Kester D, Davies F y Geneve R. (1997). Plant propagation. Principles and practices. New Jersey, Estados Unidos. Prentice Hall. 880 pp.
- ❖ Hernández S. (2006). El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina.* 252-256 pp.
- ❖ Herrera RM, Román RR, Zamilpa A, Tortoriello J y Jiménez FEJ. (2008). Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus maze test. *Journal of Ethnopharmacology.* 118:312-317.
- ❖ Huetteman CA y Preece JE. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell tissue and Organ Culture.* 29(2): 105-119 pp.
- ❖ Jaimes BJJ. (2009). Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas de los extractos en petrol y en etanol de hojas y corteza de la planta *Bursera tomentosa* (JACQ) Tr. & Pl. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias carrera de Biología. Tesis de Biólogo. Bogotá, D.C. 24-26 pp.
- ❖ Jaimes DLG y Bustamente CC. (1997). Fundamentos de Biotecnología Vegetal. *Dialnet.* 2(1): 18-29 pp.
- ❖ Jiménez-Bonilla V y Abdelnour-Esquivel A. (2016). Establecimiento *in vitro* de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica. *Tecnología en Marcha.* 29(2): 77-84 pp.
- ❖ Jiménez SCL y Matías PL. (2010). La sexualidad en las plantas. *Revista Digital Universia.* ISSN: 1067-6079. 11(8): 1-11 pp.
- ❖ Juárez RCR, Aguilar CJA, Juárez RME, Bugarín MR, Juárez LP y Cruz CE. (2013). Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista Bio ciencias.* 2(3): 119-129.
- ❖ Jurupe H, Iparraguirre D y Perez E. (1995). Estudio de la actividad antiinflamatoria de extractos de *Baccharis lanceolata* Kunth en animales de laboratorio. *Anales de la Facultad de Medicina.* 56(1): 10-12 pp.
- ❖ Kaur A, Singh R, Sharma R y Kumar S. (2012). Peptic ulcer: A review on etiology and pathogenesis. *International Research Journal of Pharmacy.* 3(6): 34-38 pp.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Lanas A, Fernández A y Sáinz R. (s/f). Sección 3. Estómago. Capítulo 18: Trastornos relacionados con la secreción gástrica ácida. 271-280 pp. Consultado en Junio de 2019, disponible en: https://www.aegastro.es/sites/default/files/archivos/ayudas-practicas/18_Trastornos_relacionados_con_la_secrecion_gastrica_acida.
- ❖ León RM, Alvarado BA, Armas GJ, Miranda AL, Varens CJ y Cuesta J. (2015). Inflammatory acute response. Biochemical and cellular considerations. *Revista Finlay*. 5(1): 47-62 pp.
- ❖ Lewis RA, Austen KF y Soberman RJ. (1990). Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *Neurol J Med*. 323: 645-655 pp.
- ❖ Lu C Y. (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. *Society for in vitro Biology*. 29(2): 92-96 pp.
- ❖ Lu L, Chan LYR, Luo XM, Wu WKK, Shin VY y Cho CH. (2014). Animal models of gastrointestinal inflammation and cancer. *Life sciences*. 108: 1-6 pp. Doi.org/10.1016/j.lfs.2014.04.036
- ❖ Luna PR, Castañón BA y Raz-Guzmán A. (2011). La biodiversidad en México: su conservación y las colecciones biológicas. *Ciencias*. (101): 36-43.
- ❖ Malkun R. (2015). Guía de técnicas, métodos y procedimientos de reproducción asexual o vegetativa de las plantas. Santo Domingo, República Dominicana. 9-11 pp.
- ❖ Manzanero MGI, Flores MA, Sandoval ZE y Bye BR. (2009). Etnobotánica de siete raíces medicinales en el mercado de sonora de la ciudad de México. *Polibotánica*. 27: 191-228.
- ❖ Martínez AL, González TMaE, Aguirre HE, Moreno J, Soto HM y López MFJ. (2009). Antinociceptive activity of *Tilia americana* variedad *mexicana* inflorescences and quercetin in the formalin test and an arthritic pain model in rats. *Neuropharmacology*. 56: 564-571 pp. Doi: 10.1016/J.neuropham.2008.10.010.
- ❖ Martínez FX y Aguila JF. (2005). Capítulo 6. Multiplicación de ornamentales por esqueje de tallo. Compendio de horticultura. Planteles. 83-102 pp. Recuperado de <https://docplayer.es/7660231-Multiplicación-de-ornamentales-por-esqueje-de-tallo.html>
- ❖ Martínez M (1969). Las Plantas Medicinales de México. D. F, México. Ed. Botas., 317 pág.
- ❖ Martínez M y Matuda E. (1979). Flora del estado de México. Tomo III. Ed. Biblioteca Enciclopédica del Estado de México. Estado de México, 495 pág.
- ❖ Martínez MD, Alvarado R, Mendoza CM y Basurto PF. (2006). Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México. Boletín de la Sociedad *Botánica de México*. (79): 79-87 pp.
- ❖ Matos MJ, Santana L, Uriarte E, Abreu O, Molina PE y Yordi E. (2015). Coumarins-An importance class of phytochemical. In Book: Phytochemicals-isolation, characterization and role in human health, Chapter 5, Publisher: In Tech, Editors: Venketeshwer Rao. 113-140 pp. Doi: 10.5772/59982.
- ❖ Menéndez CR. (2000). Acerca de las pautas de la OMS en la investigación para la evaluación de la seguridad y eficacia de los medicamentos herbolarios. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 5(1).1-5 pp.
- ❖ Mendoza EJA y Loraine S. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41(4):18-27 pp.
- ❖ Miché L y Balandreau J. (2001). Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Applied and environmental microbiology*. 67(7): 3046-3052 pp. Doi: 10.1128/AEM.67.7.30463052.2001.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Mock MC, Martin RC y Mok DWS. (2000). Cytokinins: Biosynthesis, metabolism and perception. *In vitro cell.* 36: 102-107 pp.
- ❖ Molero GR. (1997). Utilización terapéutica del omeprazol. *Farm Hosp.* 21(5): 243-256 pp.
- ❖ Mondal TK, Bhattacharya A, Sood A y Ahuja PS. (1998). Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze) using Thidiazuron. *Plant grow Regulation.* 26: 57-61 pp.
- ❖ Monroy OC, y Castillo EP. (2007). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Ed. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México, 251, 253, 319 pág.
- ❖ Muñoz FHJ, Orozco GG, García MJ, Coria AVM, Salgado GR y Santiago SMR. (2011). Épocas de colecta y tratamientos para enraizamiento de estacas de cirimo *Tilia mexicana* Schlecht. (*Tiliaceae*). *Rev. Mex. Cienc. For.* 2(3): 13-24 pp.
- ❖ Murashige T y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497 pp. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- ❖ Murthy HN, Lee E y Paek K. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolites accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 118: 1-16 pp. Doi: 10.1007/s11240-014-0467-7
- ❖ Nicasio TM del P, Meckes FM, Aguilar SL, Garduño RML, Chávez ÁVM & Cruz SF. (2012). Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta Physiol Plant* 34(1): 307-316 pp. Doi: 10.1007/s11738-011-0830-9.
- ❖ Nicasio TMP, Pérez HJ, González CM, Meckes FM, Tortoriello J y Cruz SF. (2016). Production of potential anti-inflammatory compounds in cell suspension cultures of *Spharalcea angustifolia* (Cav.) G. Don. *Acta physiol plant.* 38(209): 1-11 pp. Doi:10.1007/s11738-016-2211-x.
- ❖ Noguerón MMC, Jiménez FE, Román RR, Zamilpa A, Tortoriello J y Herrera RM. (2015). Interactions of standardized flavonoid fraction from *Tilia americana* with Serotonergic drugs in elevated plus maze. *Journal of Ethnopharmacology.* 164: 319-327.
- ❖ Nolan KER y Rose J (2010). Plant Regeneration -Somatic embryogenesis. En: *Plant Cell Culture Essentials Methods.* John Wiley & Song, Chichester, UK. 39-59 pp.
- ❖ Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. (2004). Consultado el 01 de Septiembre de 2015, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
- ❖ Ocegueda SE, Moreno E y Koleff P. (2005) Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversita.*, 62:12-15.
- ❖ Ordóñez UC, Gómez OH, Ordóñez JHR y Lagos BTC. (2012). Evaluación de un sistema de propagación vegetativa mediante esquejes en lulo silvestre *Solanum histum* Vahl, *S. marginatum* L.F., *S. sessiliflorum* Dun, *S. mammosum* L. y *S. umbellatum* Mill. *Revista de ciencias agrícolas.* 29(1): 29-41 pp.
- ❖ Ortiz PL, Cervantes GV y Chimal HA. (2017). Plantas medicinales de San Francisco Tlaltenco, Tláhuac, Ciudad de México. Primera edición. Editorial. SEDEREC. 9-10 pp. ISBN: 978-607-28-1278-9.
- ❖ Osuna FH, Osuna FA y Fierro AA. (2017). Manual de propagación de plantas superiores. Universidad Nacional Autónoma de México. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Primera edición. México, D.F. 1-5 pp.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Pan R, Gao XH, Li Y, Xia YF y Dai Y. (2009). Anti-arthritic effect of scopoletin, a coumarin compound occurring in *Erycibe obtusifolia* Beth stems, is associated with decreased angiogenesis in synovium. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 24(4): 477-490 pp. Doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00784.x
- ❖ Pasqua G, Avato P, Monacelli B, Santamaria AR y Argentieri MP. (2003). Metabolites in cell suspension cultures, calli and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* Cv. Topas. *Plant Sci*. 165: 977-982 pp.
- ❖ Patel M y Gowda S. (2012). *In vivo* animal models in preclinical evaluation of anti-inflammatory activity-A review. *International Journal Of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*. 1(2): 01-05 pp.
- ❖ Pavón N. (2000). An endangered and potentially economic tree of México: *Tilia mexicana* (Tiliaceae). *Economic Botany*. 54(1): 113-118 pp. Doi: 10.1007/BF02866605.
- ❖ Pérez OG, Guevara FP, Chávez M, Herrera J, Martínez A, Martínez AL y González TME. (2008). Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacán México. *Journal of Ethnopharmacology*. 116:461-468.
- ❖ Ramachandra R y Ravishankar GA. (2002). Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freshly suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. *J. Biotechnol*. 7:137-146 pp.
- ❖ Rendón Ag B, Rebollar DS, Caballero NJ, y Martínez AM A. (2001). Plantas, cultura y sociedad. Estudios sobre la relación entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI. México, D. F.
- ❖ Rivera OA. (2006). AINES: su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. *Revista Mexicana de Anestesiología*. 29(1): 36-40 pp.
- ❖ Rivera RMO, Vargas HJJ, López UJ, Villegas MÁ, y Jiménez CM. (2016). Enraizamiento de estacas de *Pinus patula*. *Rev. Fitotec. Mex*. 39(4): 385-392 pp.
- ❖ Roca WM y Mroginski LA. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, CO, CIAT. p. C3.41-C5.95-C10.239, 969 pp.
- ❖ Rodríguez AA, Aguilar PO y Gaytán OJC. (2015). Consumo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos en Pachuca, Hidalgo. *Salud pública de México*. 57(5): 365-366 pp.
- ❖ Saini A, Sharma N y Sharma R. (2012). Animal models to evaluate the cause behind gastric ulcers. *International Research Journal of Pharmacy*. 3(8): 34-38 pp.
- ❖ Seemann P. (1993). Utilización de técnicas de micropropagación. In: Barriga P. y Neira M. (eds). Avances en producción y sanidad vegetal. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Instituto de Producción y Sanidad vegetal. 87-109 pp.
- ❖ Seguí Simarro JM. (2014). Biología y Biotecnología Reproductiva de las Plantas. Editorial *Universia Politécnica de Valencia*. ISBN: 978-84-8363-682-4. 17-20 pp.
- ❖ Sepúlveda JG, Porta DH y Rocha SM. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3): 355-363 pp.
- ❖ Sumbul S, Ahmad M, Asif M y Akhtar M. (2011). Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 3(3): 361-368 pp. Doi: 10.4103/0975-7406.84437.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Tirado JM, Naranjo EJ y Atehortúa L. (2005). Propagación *in vitro* de *Phalaenopsis* (*Orchidaceae*) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión temporal "RITA". *Revista colombiana de Biotecnología*. 7(1): 25-31 pp.
- ❖ Tomás VS. (2002). Farmacología de los antiulcerosos. *Emergencias*. 14: S2-S13 pp.
- ❖ Toso RE y Skliar MI. (2000). Histofisiopatología y tratamiento de la úlcera gástrica. Uso de drogas vegetales. Facultad de ciencias veterinarias. Universidad Nacional de la Pampa. 1-8 pp.
- ❖ Urióstegui-Flores A. (2015). Hierbas medicinales utilizadas en la atención de enfermedades del sistema digestivo en la ciudad de Taxco, Guerrero, México. *Rev. Salud pública*. 17(1): 85-96 pp. Doi: 10.15446/rsap.v17n1.42235
- ❖ Valdivielso SA. (1998). Dolor agudo, analgesia y sedación en el niño (II): Farmacocinética y farmacodinamia de los analgésicos no opioides. *Rev. educación continuada*. 48(2): 183-194 pp.
- ❖ Vélez-Terranova M, Campos GR y Sánchez G H. (2014). Use of plant secondary metabolites to reduce ruminal methagenesis. *Tropical and subtropical Agroecosystems*. 17: 489-499 pp.
- ❖ Venugopala KN, Rashmi V y Odhav B. (2013). Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Research International*. Article ID 963248. 1-14 pp. Doi: 10.1155/2013/963248.
- ❖ Verpoorte R, Contin A y Memelink J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*. 1: 13-25 pp.
- ❖ Vilchez J, Rivas Y, Albany N, Molina M y Martínez L. (2009). Efecto de la N6-bencilaminopurina sobre la multiplicación *in vitro* de ocumo criollo (*Xanthosoma sigtiffolium* L. Schott. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 26(2): 212-222. Recuperado el 16 de octubre de 2019 de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182009000200005&lng=es&tlng=es
- ❖ Wareing RF y Phillips ID. (1973). The control of growth and differentiation in plants. Pergamann press. UK.
- ❖ Yang L, Wen K, Ruan X, Zhao Y, Wei F y Wang Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 23: 1-26 pp. Doi:10.3390/molecules23040762.
- ❖ Zimmerman JL. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*. 5(10): 1411-1423 pp.
- ❖ Zurcher E y Muller B. (2016). Cytokinin synthesis, signaling, and function-Advances and new insights. Chapter one. *International Review of cell and molecular biology*. 324: 1-38 pp. Doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.01.001
- ❖ Zurita VW, Gómez CJE, Atrián ME, Hernández GA, Granados GME, García MJJ, Salgado GR y Sánchez VNM (2014). Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (*Tiliaceae*). *Polibotánica*, (38): 129–144 pp.

11. Publicación

Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) (2019) 137:55–64
<https://doi.org/10.1007/s11240-018-01550-x>

ORIGINAL ARTICLE



Active compounds and anti-inflammatory activity of the methanolic extracts of the leaves and callus from *Tilia americana* var. *mexicana* propagated plants

Karen Flores-Sánchez^{1,2} · Francisco Cruz-Sosa² · Alejandro Zamilpa-Alvarez¹ · Pilar Nicasio-Torres¹

Received: 4 September 2018 / Accepted: 26 December 2018 / Published online: 2 January 2019
 © Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Tilia americana var. *mexicana* is used in Mexican traditional medicine to treat anxiety and inflammatory processes. Several glycosides derived from quercetin and kaempferol, including tiliroside, isoquercetin, and quercetin-3- β -D-glucoside, were reported as the main anxiolytic compounds in this species; to our knowledge, compounds with anti-inflammatory effects have not been previously described. In this study, whole plants were obtained from rooted cuttings with indole-3-butyric acid (IBA) under greenhouse conditions. Multiple shoots and callus cultures were established from apical and axillary buds from *T. americana* var. *mexicana* cuttings. The apical buds (75%) were the best explant for shoot induction (2–3 shoots per explant) on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2.0 mg L⁻¹ of 6-benzyl aminopurine plus 0.25 mg L⁻¹ α -naphthaleneacetic acid. Callogenesis occurred in both types of buds in the treatments constituted by thidiazuron with 0.1 mg L⁻¹ IBA. High-performance liquid chromatography analysis of leaves and callus methanolic extracts allowed the identification of quercetin-3- β -D-glucoside and tiliroside anxiolytic compounds, and of the scopoletin anti-inflammatory compound. The methanolic leaf and callus extracts showed anti-inflammatory activities in a 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ear edema model with median effective doses (ED₅₀) of 0.38 and 1.73 mg per ear for the leaf and callus extracts, respectively.

Keywords Anti-inflammatories · Anxiolytics · Propagation · Quercetin-3- β -D-glucoside · Scopoletin · Tiliroside

Abbreviations

BAP 6-Benzyl
 amino-9-(2-tetrahydropyranyl)-9H-purine
 IBA Indole-3-butyric acid
 BA 6-Benzyl aminopurine
 KIN Kinetin

MS Murashige and Skoog
 NAA α -Naphthaleneacetic acid
 PVPP Polyvinylpyrrolidone
 TDZ Thidiazuron
 TPA 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
 2,4-D 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

Communicated by Ranjith Pathirana.

Key message *Tilia americana* var. *mexicana* plants were propagated and callus tissues were generated from apical buds; leaf and callus methanolic extracts have quercetin-3- β -D-glucoside, tiliroside and scopoletin compounds, and were active in the ear edema mouse model.

✉ Pilar Nicasio-Torres
 pialiva@yahoo.com.mx

¹ Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina #1, 62790 Xochitepec, Morelos, Mexico

² Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico

Introduction

Tilia americana var. *mexicana* (Schldl.) Hardin is known in Mexico as *cirimo*, *tila*, and *tilia* (Martínez and Matuda 1979; Martínez 1969; Flores-Olvera and Lindig 2005). Aerial tissues of this species are used in traditional Mexican medicine to treat several central nervous system-related illnesses such as anxiety, headache, and insomnia. Infusions of flowers and fruits are also used to treat colon spasms, menstrual irregularities, rheumatism, and hypertension (Martínez 1969; Pavón and Rico 2000; Monroy-Ortiz and Castillo-España 2007). Pharmacological reports demonstrated that methanolic extracts from *T. americana* var. *mexicana*

inflorescences induced an anxiolytic effect after oral and intraperitoneal administration in mice (Aguirre-Hernández et al. 2007, 2010; Herrera-Ruiz et al. 2008). The methanolic extracts of flowers and bracts contain several glycosides that are mainly derived from quercetin and kaempferol such as tiliroside, isoquercetin, and quercetin-3- β -D-glucoside as shown in Fig. 1 (Herrera-Ruiz et al. 2008; Aguirre-Hernández et al. 2007, 2010; Noguerón-Merino et al. 2015). The sedative activities of inflorescence and leaf methanolic extracts were attributed to quercetin, rutin, and isoquercetin (Cárdenas-Rodríguez et al. 2014; Aguirre-Hernández et al. 2016). Additionally, the anti-nociceptive effects of inflorescence infusions were demonstrated and attributed to quercetin flavonoids (Martínez et al. 2009). However, the use of *T. americana* var. *mexicana* in the traditional medicine to treat illnesses that involve an inflammatory process has not been evaluated to our knowledge. Despite its important pharmacological properties, the collection of *T. americana* var. *mexicana* inflorescences from trees in their natural habitats has been restricted by the Mexican Ministry of the Environment and Natural Resources (SEMARNAT, NOM-059-ECOL-2010) because the species is considered at risk of extinction (SEMARNAT 2010) even if it is not recorded on the red list of the International Union for Conservation of Nature (IUCN). In addition, this species presents sexual propagation problems because seeds have two types of dormancy: (1) an exogenous dormancy, during which the seed coat is impermeable to water and (2) an endogenous dormancy, during which the embryo is immature (Zurita-Valencia et al. 2014).

Micropropagation studies have already been applied for *Tilia* species, including *Tilia amurensis* shoot recovery from secondary somatic embryos from cotyledon and hypocotyl explants grown on Murashige and Skoog (MS)

medium (Murashige and Skoog 1962) with 1.0 mg L⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Kim et al. 2006). In-vitro shoots of *T. platyphyllos* have been obtained from nodal segments cultured on MS medium with low concentrations of 6-benzyl amino-9-(2-tetrahydropyranil)-9H-purine (BAP), and thidiazuron (TDZ) with indole-3-butyric acid (IBA), and somatic embryogenesis was obtained from zygotic embryos grown on MS supplemented with 2,4-D (Chalupa 2003). *T. mexicana* has been propagated through axillary buds. Shoots were generated in MS medium with 0.25 mg L⁻¹ of α -naphthaleneacetic acid (NAA) and 1.0 mg L⁻¹ of 6-benzyl aminopurine (BA). Root formation was achieved with IBA after 45 days and the resulting plants had well-developed leaves and roots (Zurita-Valencia et al. 2014). Similarly, *T. mexicana* was propagated through the rooting of cuttings by applying Radix[®] rooter powder and 10,000 ppm of IBA in which 51.1% of stakes were rooted (Muñoz-Flores et al. 2011). The search for alternatives in preserving *T. americana* var. *mexicana* plants is mandatory, and despite the advances reported on the propagation of this species, to our knowledge, there are no reports on the acclimatization and growth in greenhouse and environmental conditions of these plants or on the production of active compounds by means of in-vitro callus cultures. Thus, this research focused on the propagation of *T. americana* var. *mexicana* by means of cuttings and their acclimatization; in parallel, the effects of growth regulators in apical and axillary buds on the generation of multiple buds and callus development was examined. Furthermore, the traditional use of the methanolic leaf and callus extracts as anti-inflammatory agents was evaluated using a model of acute inflammation in addition to the capacity of calluses to produce active compounds.

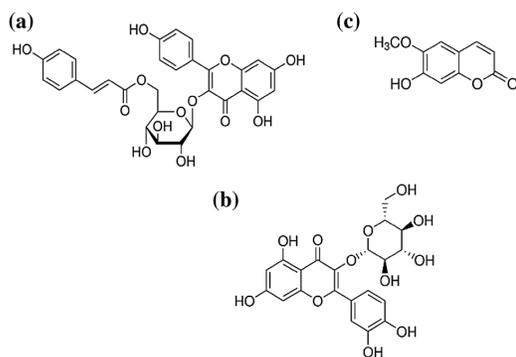


Fig. 1 Tiliroside (a) and quercetin-3- β -D-glucoside (b) active compounds isolated from inflorescences of wild trees, and scopoletin (c) detected in leaves of wild trees and callus of *Tilia americana* var. *mexicana*

Materials and methods

Plant material

Branches of *T. americana* var. *mexicana* were collected in Mexicapa, Mexico State, Mexico in October and November 2015. Tree samples were authenticated by Abigail Aguilar, M.Sc., Head of the medicinal herbarium at the Instituto Mexicano del Seguro Social in Mexico City [IMSSM], and vouchers were stored for reference under #IMSSM-5099.

Vegetative propagation

Branches were cut in lengths of 20 cm comprising three or four nodes. A horizontal cut was made in the upper end and a vertical one in the lower end of the cuttings; these were immediately submerged in water at the basal end. Later, the cutting were spliced with Radix[®] 10,000 rooting

powder (IBA, 10,000 ppm) and placed in plastic boxes (60×50×20 cm) containing a commercial substrate (Sunshine Fine mixture [70–80%] Canadian peat moss, vermiculite, ground lime [chalk], and a moisturizing agent) and a garden-soil mixture (2:1). The boxes were placed in a greenhouse under semi-shade mesh (90%) with irrigation every other day, and these were supplied with the mineral nutrients of MS medium at 25% every 15 days (Murashige and Skoog 1962; Muñoz-Flores et al. 2011). The numbers of dead and rooted cuttings were registered after 2 months. After a period of 7 months, the rooted cuttings were individualized, transferred into plastic pots (27×32 cm), and preserved under greenhouse conditions. Well-developed plants (17 months) were transferred to larger pots (55×86 cm) and exposed to environmental conditions in the CIBIS Garden at Xochitepec, Morelos, Mexico.

Induction of in-vitro cultures

In order to obtain pathogen-free buds, young apical and axillary buds from *T. americana* var. *mexicana* cuttings were removed and disinfected by a serial process of Extran® (0.5%, 1.0% v/v) and sodium hypochlorite commercial solutions (0.35%, and 0.7%, v/v) at exposure times of 2, 3, and 5 min for Extran® and of 5, 10, and 15 min for sodium hypochlorite after which time they were immediately rinsed with sterile distilled water (Borges et al. 2009). The explants were then transferred into glass containers with 40 mL of MS medium with the antibiotics chloramphenicol (50.0 mg L⁻¹) and amphotericin B (5.0 mg L⁻¹) for microbial growth inhibition (Nicasio-Torres et al. 2012). The MS medium was supplied with 30 g L⁻¹ of sucrose, 100 mg L⁻¹ of casein hydrolysate, 100 mg L⁻¹ of glutamine (Sigma–Aldrich, México), and different treatments resulting from combinations of growth regulators: (1) BA (0, 0.5, 1.0, or 2.0 mg L⁻¹) mixed with NAA at 0.25 mg L⁻¹ and/or (2) TDZ (0, 0.005, 0.01, or 0.02 mg L⁻¹) mixed with IBA at 0.1 mg L⁻¹ (Chalupa 2003; Zurita-Valencia et al. 2014). Media were adjusted to pH 5.7, 3.0 g L⁻¹ PhytaGel (Sigma–Aldrich, México), and 1.0 g L⁻¹ of polyvinylpyrrolidone (PVPP) were added and autoclaved at 1.0 kg cm⁻² for 18 min at 120 °C.

One apical or axillary bud per glass container with 20 explants per hormonal treatment were incubated at 26±2 °C during a light:dark (16-h:8-h) photoperiod under 50 μM m⁻² s⁻¹ warm white-fluorescent light intensity and relative humidity of 60%. Explants were transferred onto fresh medium every 4 weeks. The percentage of explants with evidence of shoot and/or callus development were scored for all treatments after 60 and 90 days in culture; during each period, the shoot number and leaf number per shoot were also registered. Results were compared at 60 and 90 culture days by means of factorial analysis of variance

(ANOVA) AXB (BA X TDZ) followed by a Tukey multiple-range test. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant (SAS ver. 9.1 statistical software; SAS Institute, Inc.). After 10 months in culture, callus biomasses from TDZ (0.005 mg L⁻¹) in combination with IBA (0.1 mg L⁻¹) were dried for extraction and chemical analyses.

Scopoletin, quercetin-3-β-D-glucoside, and tiliroside analyses

Three samples of dry callus biomasses and leaves from the branches were separately extracted with reagent-grade methanol (Merck, México) at 1:20 (w/v) by maceration at room temperature three times (24 h for each procedure). The methanol extracts obtained for each sample were filtered through filter paper (Whatman No. 1), pooled, and concentrated to dryness under reduced pressure. Dry callus biomasses previously obtained with 1.0 mg L⁻¹ of 2,4-D in combination with 0.5 mg L⁻¹ of kinetin (KIN) (data not shown) were also extracted for high-performance liquid chromatography (HPLC) profile comparison (Pérez-Hernández et al. 2014; Nicasio-Torres et al. 2016). The scopoletin, quercetin-3-β-D-glucoside, and tiliroside contents in each tissue were compared by ANOVA followed by Tukey multiple-range tests. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant (SAS ver. 9.1 statistical software; SAS Institute, Inc.).

Analyses of HPLC

Methanolic extract analyses were carried using a Waters system (2695 Separation Module) coupled to a diode array detector (2996) with a 190–600 nm detection range and operated by the Manager Millennium software system (Empower ver. 1; Waters Corp., Boston, MA, USA). Separation of compounds was performed in a Spherisorb® RP-18 column (250×4.6 mm, 5 μm; Waters) employing a constant temperature of 25 °C during analyses. Samples (20 μL) were eluted at a 1.0 mL min⁻¹ flow rate with (A) high-purity H₂O (with CF₃COOH to 0.5% v/v; TFA, Sigma–Aldrich, México) and (B) high-purity CH₃CN-gradient (Merck) mobile phases and detection at λ=343 nm for scopoletin (Pérez-Hernández et al. 2014; Nicasio-Torres et al. 2016), λ=355 nm for quercetin-3-β-D-glucoside, and λ=314 nm for tiliroside. Analyses of scopoletin (99%, Sigma–Aldrich, México), quercetin-3-β-D-glucoside (90%), and tiliroside (98%, Sigma–Aldrich, México) were performed by comparing their retention times (quercetin-3-β-D-glucoside, 9.22 min; scopoletin, 11.15 min, and tiliroside, 17.33 min) and absorbance spectra. Calibration curves were constructed with standard solutions of 2.5, 5, 10, and 20 μg mL⁻¹ and fitted using a linear-squares model ($y = m(x) + b$) using Microsoft Office Excel software 2010 with correlation values of ≥ 0.9995 . Scopoletin presented a regression equation of $Y = 164,224$

(X) – 34,923 with an $R^2=0.9968$. For quercetin-3- β -D-glucoside, $Y=97,701(X)-29,361$, and $R^2=0.9997$, and for tiliroside, $Y=51,931(X)-136,524$ with an $R^2=0.9984$.

TPA-induced mouse ear edema

Male ICR mice (weight, 28 g) were used and experiments were performed according to Official Mexican Regulation NOM-062-ZOO-1999 Guidelines (Technical Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals) and international ethical guidelines for the care and use of experimental animals. The mice were maintained at a temperature of 22 ± 3 °C, a humidity of $70 \pm 5\%$, with 12-h/12-h light/dark cycles and food/water *ad libitum*. The experimental protocol was authorized by the Local IMSS Health Research Committee (Registry number R-2016-1702-4).

The mice were assigned to groups of six each, and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate ([TPA]; 99% purity; Sigma–Aldrich, Mexico City, Mexico) dissolved in 20 μ L (2.5 μ g) of acetone was applied on the right ear's internal and external surfaces to generate edema. The left ear remained untreated. Doses of 0.125, 0.25, 0.5, and 0.75 mg per ear of leaves and 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, and 2.0 mg per ear of callus (TDZ/IBA) methanolic extracts, and indomethacin as positive control (99% purity; Sigma–Aldrich) were dissolved in acetone and applied topically to both ears immediately after TPA administration.

Four hours after inflammatory agent administration, the animals were sacrificed by cervical dislocation, and circular sections (6 mm in diameter) were taken from both treated and non-treated ears. The ear sections were immediately weighed to determine ear edema by difference in weight. Percentage of inhibition was obtained utilizing the following expression: $\text{Inhibition \%} = ([\text{control} - \text{treatment}/\text{control}] \times 100)$ (Murugananthan and Shivalinge Gowda 2012). A curve of the doses of leaves or callus methanolic extracts versus ear-edema inhibition were fit using a linear least-squares regression model $(y) = m(x) + b$ utilizing Microsoft Office Excel 2010 software. The resulting m and b parameters were employed in order to determine the median effective dose (ED_{50}) of leaf and callus methanolic extracts.

Results and discussion

Obtaining plants of *T. americana* var. *mexicana* by means of cuttings

Cuttings of *T. americana* var. *mexicana* were used as source of shoots. A total of 60% of the cuttings produced buds after 8 days of cultivation; their first leaves were



Fig. 2 Propagation process of *Tilia americana* var. *mexicana*: cuts (a), cuttings with shoots after 25 days at greenhouse (b), plants after 7-months (c), and plants in environmental conditions cultivated in plastic pots with commercial substrate and garden-soil mixture after 17-months (d)

heart-shaped and pink and green in color (Fig. 2a). After 25 days, the shoots turned green and developed a large number of apical and axillary buds (Fig. 2b). Only 3.12% of the viable cuttings showed resistance when we tried to remove them, suggesting that they were rooting. After 7 months, whole plants of *T. americana* var. *mexicana* with new stems and green leaves were obtained under greenhouse conditions. Vigorous plants (35–93 cm with 3–5 branches) of 17 months were exposed to environmental conditions (Fig. 2c, d). The rooting of a cutting is influenced by the type of hormone used, the physiology of the branch, and the geographical region in which it grows, among other factors. Whole plants of *T. americana* var. *mexicana* were obtained from cuttings collected during the months of October and November after the period of fructification and rooting with Radix® 10,000 and IBA (Muñoz-Flores et al. 2011; Pavón and Rico 2000).

In-vitro culture induction

The most effective disinfection process of viable apical and axillary buds (95%) occurred with 0.5% Extran[®] for 5 min and 0.7% NaOCl for 15 min and was applied in all of the following experiments. The resulting explants were green and exhibited a slight brown color in the cut areas (Fig. 3b, f). Extran[®] is a neutral liquid solution of anionic and non-ionic surfactants and phosphates used as an excellent disinfectant in various laboratory processes; in addition, its use is safe for the environment and humans.

The apical and axillary buds of *T. americana* var. *mexicana* cultured in hormone-free MS medium (control) did not develop callus or shoots. Twenty percent of both bud types were elongated, but their elongation was lower than that observed in buds grown on MS medium supplemented with TDZ and/or with BA (Fig. 3c, g). After 30 days of culture, the buds did not form shoots or callus in any of the treatments evaluated (Fig. 3b, f), they remained green and the leaf primordia began to open. By day 60, shoot formation and callogenesis varied according to the type and concentration of the cytokinin used. Based on ANOVA and the Tukey *post-test*_{0.05} (Table 1), it was determined that in apical buds, shoot formation was similar when these were grown on MS medium supplemented with BA or TDZ ($p > 0.05$); however, after 90 days, the apical bud number with shoots increased

only on MS medium supplemented with the highest concentration of BA (2.0 mg L^{-1}) in combination with 0.25 mg L^{-1} of NAA. Instead, the apical-bud mainly developed calluses (Table 1) at 60 days in culture in the MS medium supplemented with TDZ plus 0.1 mg L^{-1} of IBA and increased further in correlation with TDZ concentration after 90 days in culture.

When axillary buds were used as the explant, bud elongation and shoot formation depended on the selected hormone. After 60 days, maximal responses were obtained with the reduction of BA concentration (Table 1), and this response increased by 90 days. Conversely, with TDZ the axillary buds mainly developed calluses (Table 1) at 60 days in culture, and callusing increased with TDZ concentration and culture time.

In general, the shoots obtained were green with an average height of 2.0 cm and green and dentate leaves (Fig. 3c, g). The generated calluses were all beige and semi-hard with a brown hue with BA (Fig. 3d), while those obtained with TDZ (Fig. 3h) were friable with a pink hue. In both treatments, shoot development and rhizogenesis were not observed.

These results differ from those reported by Zurita-Valencia et al. (2014), who obtained the best induction of shoot in axillary buds of *T. mexicana* on MS medium with 1.0 mg L^{-1} BA plus 0.25 mg L^{-1} NAA, while the best response in our study

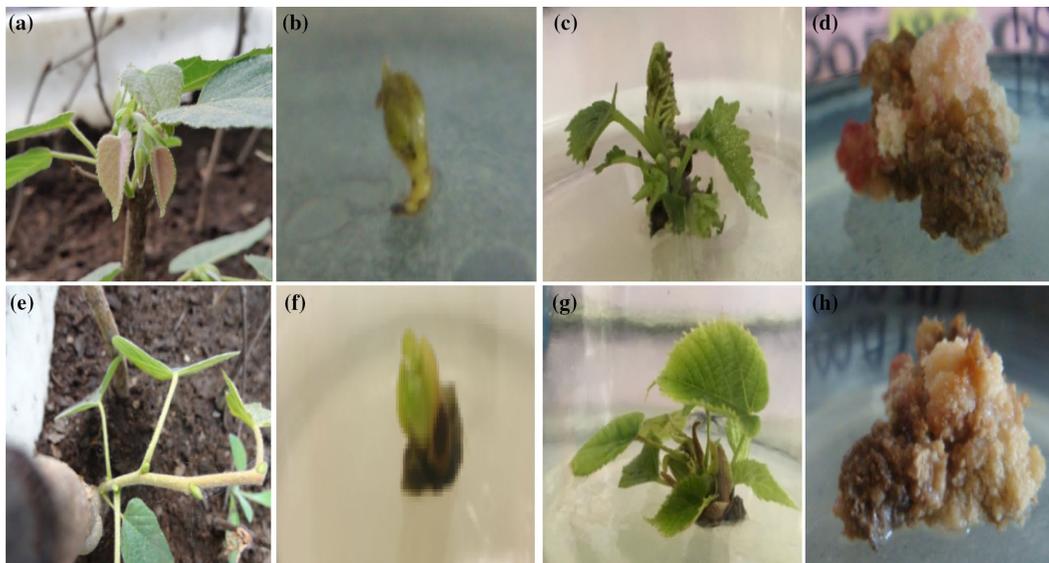


Fig. 3 Apical buds **a** from *Tilia americana* var. *mexicana* cuttings, **b** cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium, **c** shoots after 90 days cultivated with 2.0 mg L^{-1} 6-benzylaminopurine (BA) with 0.25 mg L^{-1} α -naphthaleneacetic acid (NAA), and callus, **d** with 0.005 mg L^{-1} thidiazuron (TDZ) with 0.1 mg L^{-1} indole-

3-butyric acid (IBA). Axillary buds from cuttings (**e**), cultivated on MS medium (**f**) and axillary bud with shoots after 90 days (**g**), with 0.5 mg L^{-1} of BA with 0.25 mg L^{-1} NAA, and callus (**h**) with 0.02 mg L^{-1} TDZ with 0.1 mg L^{-1} IBA

Table 1 Effect of 6-benzylaminopurine (BA) and thidiazuron (TDZ) concentrations on survivor explants and the development of callus and shoots on apical and axillary buds of *Tilia americana* var. *mexicana*

Explant	Time (days)	Treatment (mg L ⁻¹)		Explants with shoots (%)	F	p	Explant (%) / shoot number	Explants with callus (%)	F	p		
		BA	TDZ									
Apical bud	60	0.5	–	50	NS	10 (2)	15	26.06	0.0001	60		
		1.0	–	50			–				15	
		2.0	–	40			–				5	
		–	0.005	45			–				20 (2–4)	50**
		–	0.01	50			–				–	50**
	90	–	0.02	35	–	–	55**					
		0.5	–	55	2.7	0.1	15 (2)	15	58.11	0.0001		
		1.0	–	50	6	–	–	20				
		2.0	–	75**	–	–	35 (2–3)	5				
		–	0.005	45	–	–	45 (2–4)	60**				
–	0.01	50	–	–	–	70**						
Axillary bud	60	–	0.02	14	5.12	0.008	4 (2)	20	11.75	0.0008		
		0.5	–	55**			–				–	65**
		1.0	–	25			–				–	25
		2.0	–	10			–				–	45
		–	0.005	20			–				–	60**
		–	0.01	0			–				–	60**
		–	0.02	20			–				–	55**
	90	0.5	–	60**	5.66	0.005	30 (2–3)	20	12.56	0.0006		
		1.0	–	25	–	–	–	40				
		2.0	–	10	–	–	–	65				
		–	0.005	20	–	–	–	70				
		–	0.01	0	–	–	–	65				
		–	0.02	25	–	–	–	80**				

BA in combination with 0.25 mg L⁻¹ α -naphthaleneacetic acid (NAA)

TDZ in combination with 0.1 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA)

NS, not significant; values with ** are different statistically according to Tukey_{0.05} test ($p \leq 0.05$)

was observed with 0.005 mg L⁻¹ TDZ plus 0.1 mg L⁻¹ IBA at 90 days of culture in which 2–4 shoots per explant developed (Table 1). In explants of axillary buds in *T. platyphyllos*, the highest response was obtained using lower BA concentrations (0.6 mg L⁻¹) and TDZ (0.005 mg L⁻¹) in combination with 0.1 mg L⁻¹ IBA (Chalupa 2003). Several factors can influence cellular differentiation such as type of explant, the type and concentration of selected plant growth regulators, and the culture medium, among others (Coste et al. 2012; Martínez et al. 2017). Thus, in explants of *T. cordata* and *T. amurensis*, 1.0–5.0 mg L⁻¹ BA promoted the formation of 3–5 shoots/explant (Zurita-Valencia et al. 2014).

Scopoletin, quercetin-3- β -D-glucoside, and tiliroside contents

HPLC analysis of the methanolic extracts of *T. americana* var. *mexicana* from leaves of wild trees and calluses

from apical-buds developed with 0.005 mg L⁻¹ TDZ plus 0.1 mg L⁻¹ IBA (Fig. 4), revealed the presence of quercetin-3- β -D-glucoside (tr = 9.220 min), scopoletin (tr = 11.155 min), and tiliroside (tr = 17.481 min). The ANOVA and Tukey_{0.05} *post*-test indicated that wild tree leaves had higher content of scopoletin, while the quercetin-3- β -D-glucoside content was superior in callus, and the tiliroside content was similar in both (Table 2). These differences are possibly due to the time of plant collection because the physiological conditions of the plants change with the seasons and different environmental factors such as light, temperature, water, soil type, and salinity (Figueiredo et al. 2008; Yang et al. 2018). Scopoletin content in callus was similar, and quercetin-3- β -D-glucoside content was higher than that detected in the callus previously produced (data not shown) from leaf explants on MS medium with 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.5 mg L⁻¹ KIN. In addition, in those calluses, tiliroside

Fig. 4 Chromatograms for quercetin-3- β -D-glucoside ($\lambda = 355$ nm; 9.2 min), scopoletin ($\lambda = 343$ nm; 11.1 min) and tiliroside ($\lambda = 314$ nm; 17.3 min) detected in methanolic extracts of leaves (a), and leaf (b) and apical bud (c) calluses of *Tilia americana* var. *mexicana* cultivated on Murashige and Skoog (MS) medium with 2.0 mg L⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with 0.5 mg L⁻¹ of kinetin (KIN), and 0.005 mg L⁻¹ thidiazuron (TDZ) with 0.1 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA), respectively

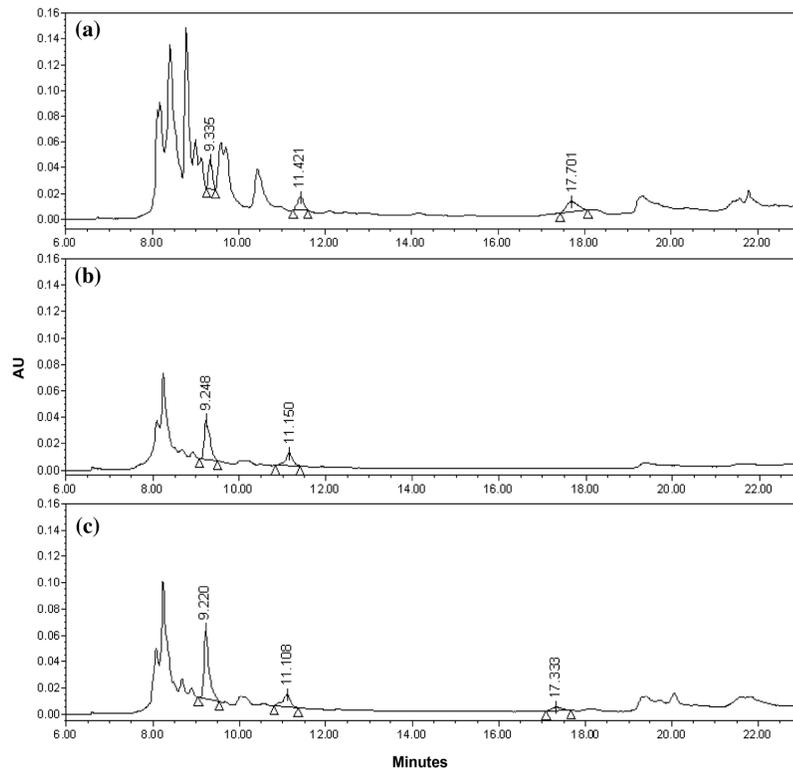


Table 2 Contents of active compounds in methanolic extracts from leaves and callus of *Tilia americana* var. *mexicana*

Vegetal tissues	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ biomass)		
	Scopoletin	Quercetin-3- β -D-glucoside	Tiliroside
Cutting leaves	11.30 \pm 0.42**	23.55 \pm 2.74	97.38 \pm 9.62
Callus from apical buds ^a	7.64 \pm 2.30	115.86 \pm 4.02**	88.24 \pm 1.01
Callus from leaf explant ^b	4.47 \pm 6.01	55.10 \pm 5.00*	ND
<i>p</i>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

Values with ** and * are statistically different according to the Tukey_{0,05} test ($p \leq 0.05$)

ND, non detected

^aCallus from apical bud cultivated on MS medium with 0.005 mg L⁻¹ thidiazuron (TDZ) in combination with 0.1 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA)

^bCallus from leaf explants cultivated on MS medium with 2.0 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in combination with 0.5 mg L⁻¹ kinetin (KIN)

was not detected. This difference in the chemical profile could be due to the growth regulators employed for callus generation in addition to the origin of the explant, implying the expression of genetic, ontogenetic, and morphogenetic factors (Figueiredo et al. 2008; Muñoz-Flores et al. 2011; Yang et al. 2018). These callus tissues could be an alternative for cell-suspension development for active compound production (Verpoorte et al. 2002; Murthy et al. 2014).

Anti-inflammatory activity

TPA-induced auricular edema in mice was employed as a substance capable of causing local inflammation characterized by vasodilatation, cellular infiltration, and erythema during the first 3 or 4 h after irritant application (Muruganathan and Shivalinge Gowda 2012). In the negative control group, the maximal inflammation level, evaluated as the increase in the weight of the auricular edema, was 10.31 mg

Table 3 Effect of leaves and callus methanolic extracts of *Tilia americana* var. *mexicana* on auricular edema induced with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)

Treatment	Doses (mg/ear)	Ear weight (mg)	Edema inhibition (%)
TPA	–	10.31 ± 0.74	–
Indomethacin	0.50	3.46 ± 0.34	65.23 ± 3.42
Leaves methanolic extract	0.125	10.38 ± 0.15	5.50 ± 1.99
	0.25	7.52 ± 0.90	32.00 ± 8.17
	0.50	4.23 ± 0.55	57.45 ± 5.49
	0.75	1.70 ± 0.89	82.91 ± 8.92
Callus methanolic extract from apical buds	1.00	9.30 ± 0.21	12.85 ± 1.93
	1.50	7.90 ± 0.48	28.16 ± 4.62
	1.75	5.58 ± 0.34	47.71 ± 3.14
	2.00	3.28 ± 0.38	70.15 ± 1.60

Mean ± standard deviation of the mean (n=5)

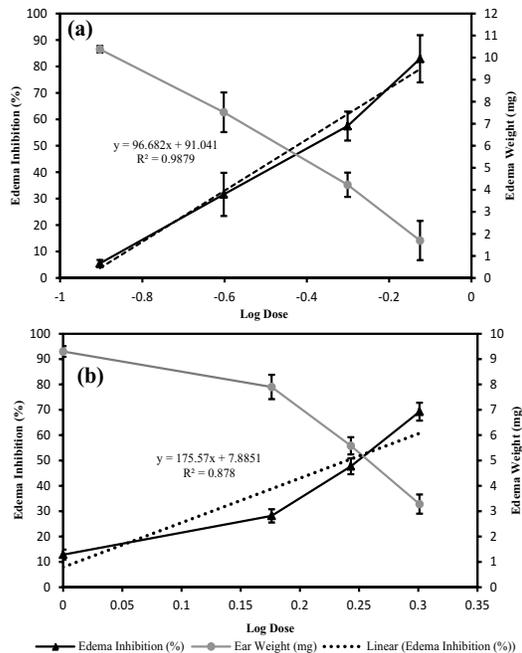


Fig. 5 Relationship between the doses of leaves (a) and callus (b) methanolic extracts from *Tilia americana* var. *mexicana* and ear edema inhibition, as well as versus 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced ear edema weight. The “best-fit” line shown was generated by linear regression of the data (n=5); squares of correlation coefficient (R^2) regression equations is reported. Vertical bars represent the standard deviation of the means (n=5)

(100%) after 4 h (Table 3). The ear-edema weights in the groups treated with leaves and callus methanolic extracts in addition to indomethacin were lower than those produced in the negative control group (Table 3). The methanolic leaf extract at 0.5 mg per ear exerted a similar effect to that of indomethacin, which was dose-dependent with a median effective dose (ED_{50}) of 0.38 mg per ear (Fig. 5).

The ED_{50} of 1.73 mg per ear of the methanolic callus extract was higher than that determined for the leaf methanolic extract, possibly because the scopoletin content in the callus is lower than that in the leaves. The anti-inflammatory and anti-arthritis effects of scopoletin from plants have already been reported (Pan et al. 2010; García-Rodríguez et al. 2012). It will be important to isolate and identify the anti-inflammatory compounds produced in callus tissues and leaves of wild plants other than scopoletin. It will also be important to evaluate elicitors to increase the production of compounds with anxiolytic activity and in addition, to test other systems for the in-vitro propagation of *Tilia americana* var. *mexicana*.

Conclusions

Tilia americana var. *mexicana* plants were obtained through the rooting of cuttings that currently grow in an experimental land parcel. In the methanolic extract of the leaves, the content of compounds with anxiolytic activity such as quercetin-3- β -D-glucoside and tiliroside was determined; this extract was also active in the model of a TPA-induced ear edema. In parallel, callus cultures were obtained from the axillary buds from cuttings in MS medium complemented with TDZ/IBA; these tissues have also anti-inflammatory activity and the capacity to produce some of the active compounds detected in the leaves.

Acknowledgements This work was supported by Basic Grant 593703 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT-México) for the Doctoral studies of Karen Flores-Sánchez at the Biotechnology Doctoral Program of UAM-Iztapalapa; and by Complementary Grant 99182548 from the IMSS.

Author contributions As a Ph.D. student, KF-S participated in all of the experimental work, in the collection, analysis, and interpretation of data, and in the writing of the manuscript. FC-S supervised the establishment of the factorial design experiments, provided the scopoletin, quercetin-3- β -D-glucoside, and tiliroside standards, and was

the Thesis Co-Director of KF-S. A-Z participated in the extraction and in establishment of analytical methods for the quantification of compounds. PN-T performed the supervision of the establishment of in-vitro cultures and the evaluation of anti-inflammatory activity, and also was the Thesis Co-director of KF-S, participating in the writing of the manuscript and approving the final version of the manuscript to be submitted.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aguirre-Hernández E, Martínez AL, González-Trujano ME, Moreno J, Vibrans H, Soto-Hernández M (2007) Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice. *J Ethnopharmacol* 109:140–145. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.017>
- Aguirre-Hernández E, González-Trujano ME, Martínez AL, 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* var. *mexicana*. *J Ethnopharmacol* 127:91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.044>
- Aguirre-Hernández E, González-Trujano ME, Terrazas T, Herrera-Santoyo J, Guevara-Fefer P (2016) Anxiolytic and sedative-like effects of flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*: GABAergic and serotonergic participation. *Salud Mental* 39(1):37–46. <https://doi.org/10.17711/SM.0185-3325.2015.066>
- Borges GM, Estrada AE, Pérez RI, Meneses RS (2009) Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Rev Colomb Biotecnol* 11(2):127–135. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Cárdenas-Rodríguez N, González-Trujano ME, Aguirre-Hernández E, Ruiz-García M, Sampieri A, Coballase-Urrutia E, Carmona-Aparicio L (2014) Anticonvulsant and antioxidant effects of *Tilia americana* var. *mexicana* and flavonoids constituents in the Pentylenetetrazole induced seizures. *Oxid Med Cell Longev*. 2014: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/329172>
- Chalupa V (2003) *In vitro* propagation of *Tilia platyphyllos* by axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis. *J For Sci* 49(12):537–543. <https://doi.org/10.17221/4722JFS>
- Coste A, Halmagyi A, Butiuc-Keul AL, Daliu C, Coldea G, Hurdu B (2012) *In vitro* propagation and cryopreservation of Romanian endemic and rare *Hypericum* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 110(2):213–226. <https://doi.org/10.1007/s11230-012-0144-7>
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr J* 23(4):213–226. <https://doi.org/10.1002/ffj.1875>
- Flores-Olvera MH, Lindig-Cisneros R (2005) Listado de nombres vulgares y botánicos de árboles y arbustos propicios para repoblar los bosques de la República de Fernando Altamirano y José Ramírez a más de 110 años de su publicación. *Rev Mex Biodiversidad* 76:11–35. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2005.001.362>
- García-Rodríguez RV, Chamorro-Cevallos G, Siordia G, Jiménez-Arellanes MA, Chávez-Soto MA, Meckes-Fischer M (2012) *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don extract, a potential phytomedicine to treat chronic inflammation. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 11:454–463
- Herrera-Ruiz M, Román-Ramos R, Zamilpa A, Tortoriello J, Jiménez-Ferrer JE (2008) Flavonoids from *Tilia americana* with anxiolytic activity in plus maze test. *J Ethnopharmacol* 118:312–317. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.04.019>
- Kim TD, Choi YE, Lee BS, Kim YJ, Kim TS, Kim IS (2006) Micropropagation of *Tilia amurensis* via repetitive secondary somatic embryogenesis. *Plant Biotechnol J* 33(4):243–248. <https://doi.org/10.5010/JPB.2006.33.4.243>
- Martínez M (1969) *Las Plantas Medicinales de México*. Botas, Mexico, p 317
- Martínez M, Matuda E (1979) *Flora del estado de México*. Tomo III. Ed. Biblioteca Enciclopédica del Estado de México, México, p 495
- Martínez AL, González-Trujano E, Aguirre-Hernández E, Moreno J, Soto-Hernández M, López-Muñoz J (2009) Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. *Mexicana* inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rats. *Neuropharmacology* 55:564–571. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.10.010>
- Martínez MT, Corredoira E, Viéitez AM, Cernadas MJ, Montenegro R, Ballester A, Viéitez FJ, San Jose MC (2017) Micropropagation of mature *Quercus ilex* L. trees by axillary budding. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 131:499–512. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1300-x>
- Monroy-Ortiz C, Castillo-España P (2007) *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos*. Ed. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, pp 253–319
- Muñoz-Flores HJ, Orozco-Gutiérrez G, García-Magaña J, Coria-Ávalos VM, Salgado-Garcicla R, Santiago-Santiago MR (2011) Épocas de colecta y tratamiento para enraizamiento de estacas de cirimo *Tilia mexicana* Schlecht. (*Tiliaceae*). *Rev Mex Cienc For* 2(3):13–23
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 118:1–16. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7>
- Muruganathan MP, Shivalinge Gowda KP (2012) *In vivo* animal models in preclinical evaluation of anti-inflammatory activity—a review. *Int J Pharm Res Allied Sci* 1(2):01–05
- Nicasio-Torres MP, Meckes-Fischer M, Aguilar-Santamaría L, Garduño-Ramírez ML, Chávez-Ávila VM, Cruz-Sosa F (2012) Production of chlorogenic acid and isoorientine hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta Physiol. Plant* 34(1):307–316. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0830-9>
- Nicasio-Torres MP, 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 Physiol. Plant* 38:209. <https://doi.org/10.1007/s1173-016-2211-x>
- Noguerón-Merino MC, Jiménez-Ferrer E, Román-Ramos R, Zamilpa A, Tortoriello J, Herrera-Ruiz M (2015) Interactions of standardized flavonoid fraction from *Tilia americana* with serotonergic drugs in elevated plus maze. *J Ethnopharmacol* 164:319–327. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.029>
- Pan R, Gao XH, Li Y, Xia YF, Dai Y (2010) Anti-arthritis effect of Scopoletin, a coumarin compound occurring in *Erycibe obtusifolia* Benth stems, is associated with decreased angiogenesis in synovium. *Fundam Clin Pharmacol* 24:477–490. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00784.x>

- Pavón NP, Rico GV (2000) An endangered and potentially economic tree of Mexico: *Tilia mexicana* (Tiliaceae). *Econ Bot* 54:113–114. <https://doi.org/10.1007/BF02866605>
- Pérez-Hernández J, González-Cortázar M, Marquina S, Herrera-Ruiz M, Meckes-Fischer M, Tortoriello J, Cruz-Sosa F, Nicasio-Torres MP (2014) Sphaeralcic acid and Tomentin, anti-inflammatory compounds produced in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia*. *Planta Med* 80:1–6. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1360302>
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, 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. Diario Oficial de la Federación, México, pp 77
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1:13–25. <https://doi.org/10.1023/A:1015871916833>
- Yang L, Wen KS, Ruan X, Zhao YX, Wei F, Wang Q (2018) Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules* 23(4):762. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Zurita-Valencia W, Gómez-Cruz JE, Atrián-Mendoza E, Hernández-García A, Granados-García ME, García-Magaña JJ, Salgado-Garciglia R, Sánchez-Vargas NM (2014) Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae). *Polibotanica* 38:129–144

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Acta De Disertación Pública



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00233

Matrícula: 2153804287

Actividad anti-inflamatoria y anti-ulcerogénica de hojas de planta silvestre y tejidos desdiferenciados de *Tilia americana* variedad mexicana (Schlttd) Hardin.



KAREN JHOANA FLORES SANCHEZ
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DRA. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO

VOCAL

DR. ANTONIO ROMERO ESTRADA

SECRETARIO

DR. ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 27 del mes de octubre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DRA. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO
DR. ANTONIO ROMERO ESTRADA
DR. ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ

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:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: KAREN JHOANA FLORES SANCHEZ

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 a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella