



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Producción de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica a partir de células transformadas en suspensión de *Lopezia racemosa Cav.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

BIOL. JOSÉ LUIS LÓPEZ ANGELES

DIRECTOR: DR. JOSÉ DE JESÚS ARELLANO GARCÍA

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2019

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN	IV
ABSTRAC	V
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2. ANTECEDENTES	3
2.1 Plantas medicinales.....	3
2.2 Metabolitos secundarios	3
2.2.1 Compuestos de origen fenólico	4
2.2.2 Terpenos y esteroides	4
2.2.3 Alcaloides	5
2.2.4 Importancia de los metabolitos secundarios	6
2.3 El cultivo de tejidos vegetales	6
2.4 Reguladores de crecimiento vegetal.....	7
2.4.1 Auxinas	8
2.4.2 Biosíntesis de auxinas	8
2.4.3 Citocininas	10
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de callos.....	11
2.6 Suspensiones celulares	11
2.7 Transformación genética de células vegetales.....	12
2.8 Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i>	13
2.9 Cultivo de raíces pilosas	14
2.10 <i>Lopezia racemosa</i> Cav.....	15
2.10.1 Análisis fitoquímico y actividad farmacológica de <i>Lopezia racemosa</i> Cav	17
2.10.2 Cultivo <i>in vitro</i> en <i>Lopezia racemosa</i>	19
CAPITULO 3. JUSTIFICACIÓN.....	21
CAPITULO 4. HIPÓTESIS	22
CAPITULO 5. OBJETIVO GENERAL.....	23

5.1 Objetivos particulares	23
CAPITULO 6 METODOLOGÍA.....	24
6.1 Obtención del material vegetal	24
6.2 Medio de cultivo	24
6.2.1 Medio MS/B5 semisólido.....	24
6.2.2 Medio MS/B5 líquido	24
6.3 Proliferación de biomasa	24
6.4 Obtención y evaluación de extractos de callos de la línea LRT 3.1	25
6.5 Efecto de diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D en cultivo de callos	25
6.6 Establecimiento de los cultivos de células en suspensión	26
6.7 Efecto de un amortiguador de pH (MES) y un antioxidante (ácido ascórbico) a diferentes concentraciones en cultivo de células en suspensión de <i>L. racemosa</i> Cav	26
6.8 Cinética de crecimiento	27
6.9 Viabilidad celular	28
6.10 Determinación de consumo de carbohidratos	29
6.11 Preparación de extractos y cuantificación de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica	29
6.12 Evaluación de la actividad antiinflamatoria	30
6.13 Evaluación de la actividad citotóxica.....	31
CAPITULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
7.1 Evaluación del efecto de BAP y 2,4-D a diferentes concentraciones	32
7.1.1 Evaluación visual.....	32
7.1.2 Evaluación del aumento de biomasa: Índice de crecimiento.....	33
7.2 Evaluación del efecto de MES y ácido ascórbico sobre el crecimiento del cultivo de células en suspensión	37
7.3 Cinética de crecimiento de células en suspensión	41
7.3.1 Determinación del crecimiento celular	41
7.3.2 Viabilidad celular	44
7.5 Evaluación de parámetros cinéticos en el medio de cultivo.....	47
7.5.1 Evaluación de pH	47
7.5.2 Evaluación de la conductividad.....	49

7.6 Consumo de carbohidratos en el medio de cultivo.....	50
7.6.1 Curvas de calibración	50
7.6.2 Consumo de carbohidratos	51
7.7 Cromatografía en capa fina	53
7.8 Obtención de extractos	55
7.9 Actividad farmacológica	57
7.9.1 Actividad antiinflamatoria.....	50
7.9.2 Actividad citotóxica	51
CAPITULO 8. CONCLUSIONES	61
CAPITULO 9. PERSPECTIVAS	62
CAPITULO 10. BIBLIOGRAFIA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ruta de biosíntesis de los terpenos.....	5
Figura 2 Estructura química del ácido indol-3-acético	8
Figura 3 Biosíntesis de AIA en plantas.....	9
Figura 4 Estructura química de la zeatina	10
Figura 5 Curva de crecimiento	12
Figura 6 Modo de infección de <i>Agrobacterium</i>	14
Figura 7 Distribución de la especie <i>Lopezia racemosa</i> en México.....	15
Figura 8 <i>Lopezia racemosa</i> Cav	16
Figura 9 Estructura química de 1) LR1 y 2) LR2	17
Figura 10 Estructura química de LR3.....	18
Figura 11 Organogénesis directa, organogénesis indirecta de <i>L. racemosa</i> Cav	19
Figura 12 Células en suspensión de <i>L. racemosa</i> tratadas con diferentes concentraciones de MES y ácido ascórbico	37
Figura 13 Viabilidad celular del cultivo de células en suspensión de <i>L. racemosa</i>	44
Figura 14 Cromatoplaqueta de los extractos obtenidos a partir de las células en suspensión	54
Figura 15 Cromatoplaqueta de los extractos obtenidos a partir de callos LRT 3.1.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clase de regulador de crecimiento vegetal, función asociada y usos prácticos.....	7
Tabla 2 tratamientos empleados para la proliferación de biomasa	25
Tabla 3 Tratamientos empleados para evaluar el efecto de MES y ácido ascórbico	27
Tabla 4 Evaluación de los tratamientos mediante parámetros visuales	32
Tabla 5 Índice de crecimiento, peso fresco y peso seco de cada tratamiento de callos	30
Tabla 6 Análisis de Varianza y prueba de tukey-HSD, del aumento en biomasa.....	39
Tabla 7 Velocidades específicas máximas de crecimiento en cultivos celulares	43
Tabla 8 Porcentaje de viabilidad celular durante la cinética de crecimiento.....	45
Tabla 9 Rendimiento de los extractos de cada punto de la cinética de crecimiento	53
Tabla 10 Rendimiento de extractos de cultivo de callos.....	55
Tabla 11 Actividad citotóxica de extractos de CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH de cultivos de callos y células en suspensión	59

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1 Grafica de peso seco e índice de crecimiento de callos derivados de raíces pilosas de la línea LRT 3.1.	35
Gráfico 2 Crecimiento en base a peso seco y variación de pH de los 16 tratamientos, evaluando MES y ác. ascórbico	38
Gráfico 3 Curvas de crecimiento en base a peso fresco y peso seco del cultivo de células en suspensión.....	41
Gráfico 4 Fase de crecimiento exponencial en LOG ₁₀	42
Gráfico 5 Porcentaje de viabilidad celular durante la cinética de crecimiento.....	46
Gráfico 6 Curva de los valores de peso seco y pH a lo largo de la cinética.	47
Gráfico 7 Curva de los valores de peso seco y conductividad	49
Gráfico 8 Curvas de calibración de los azúcares.....	43
Gráfico 9 Curva de consumo de azúcares, fructosa, glucosa y sacarosa.....	44
Gráfico 10 Porcentaje de inhibición de la inflamación.....	57
Gráfico11 Curva de dosis respuesta del extracto CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH.....	58

ABREVIATURAS

ANA	Ácido naftalénacetico
BAP	6-bencilaminopurina
CasKi	Cáncer de Cérvix
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DMAPP	Isopentil difosfato
FPP	Farnesil difosfato
GPP	Geranil difosfato
HeLa	Carcinoma cervicouterino
HCT-15	Adenocarcinoma colateral
IAA	Ácido indol 3-acético
IPA	Ácido indol 3-pirúvico
IPP	Dimetilalil difosfato
LR1	6-O-palmitoil-3-O- β -D-glucopiranosilcampesterol
LR2	6-O-palmitoil-3-O- β -D-glucosido de β -sitosterol
LR3	23 <i>R</i>)-2 α ,3 β ,23,28-tetrahidroxi-14,15-dehidrocampesterol
MEP	Metil eritrol fosfato
MES	Morfolino etano sulfanato
OVCAR	Carcinoma de ovario
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
Ri	Inductor de raíces
TAM	Ruta de la triptamina
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
Ti	Tumor inductor
TPA	13-acetato del 12-O-tetradecanoilforbol
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético

RESUMEN

Lopezia racemosa Cav., es utilizada en la medicina tradicional para tratar dolores de estómago, úlceras, infecciones en la piel e incluso el cáncer de estómago. Diversos estudios demuestran que los extractos de esta planta presentan actividad antiinflamatoria y citotóxica, además de que a partir de éstos se han logrado identificar compuestos, los cuales han mostrado tener actividad antiinflamatoria y citotóxica. También se ha evaluado la producción de metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria en callos, plantas micropropagadas, así como en cultivos de células en suspensión y cultivo de raíces pilosas de esta especie vegetal.

El presente trabajo reporta el establecimiento de cultivos de células en suspensión transformados derivados de la línea de raíces pilosas LRT3.1 que mejoraron su capacidad de crecimiento mediante la adición del amortiguador de pH ácido morfolinetansulfónico (MES); así mismo, se reporta el efecto del antioxidante ácido ascórbico a distintas concentraciones, sobre el crecimiento de éstas mismas células al evitar la oxidación observada previamente en los cultivos, además se reporta la adición de auxinas y citocininas a distintas concentraciones, con la finalidad promover su crecimiento. Finalmente se reportan los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento y producción de metabolitos con actividad antiinflamatoria y citotóxica realizada en las células en suspensión derivadas la línea LRT3.1 de raíces transformadas. La actividad antiinflamatoria fue evaluada en el modelo de oreja de ratón inducida por 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA), obteniendo que los extractos de callos y células en suspensión derivados de la línea LRT 3.1 fueron las más activas con un CL_{50} de 0.43 mg/oreja. Con respecto a la actividad citotóxica se encontró que los extractos de callos y células en suspensión de la línea LRT 3.1 mostraron ser activas contra la línea de cáncer de cérvix (CasKi).

ABSTRACT

Lopezia racemosa Cav., is used in traditional Mexican medicine to treat stomach aches, ulcers, skin infections and even stomach cancer. Several studies show that extracts of this plant have anti-inflammatory and cytotoxic activity; additionally there had been identified compounds, which have shown anti-inflammatory and cytotoxic activity. The production of secondary metabolites with anti-inflammatory activity in callus, micropropagated plants, as well as cell suspension cultures and hairy roots had also been evaluated in this plant species.

The present work reports the establishment of transformed cell suspension cultures derived from the hairy root line LRT3.1 with improved growth capacity by the addition of the pH buffer morpholinene-sulfonate acid (MES). Additionally, we report that the antioxidant ascorbic acid at different concentrations, also improve the growth of these cells cultures by avoiding the oxidation previously observed in the cultures. The addition of auxins and cytokinins at different concentrations is reported as well, since these plant growth regulators were used in order to promote growth and cell division to increase biomass production. Finally, this work report the results obtained from the kinetics of growth and production of metabolites with antiinflammatory and cytotoxic activity carried out in such cell suspension cultures derived from the line LRT3.1 of transformed hairy roots.

The anti-inflammatory activity of the extracts obtained from calluses and cell suspension cultures derived from the line LRT 3.1, was evaluated in the mouse ear model induced by 12-O-tetradecanoylphorbol13-acetate (TPA). The higher activity was obtained from the cell suspension cultures with a LC₅₀ of 0.43 mg/ear. With regard to the cytotoxic activity of extracts obtained from callus and cell suspension cultures of the line LRT 3.1, both were found to be active against the cervical cancer line Caski.

CAPITULO 1. INTRODUCCION

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a una planta medicinal como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser usadas con propósitos terapéuticos o bien, que sus principios activos sean utilizados como precursores para la síntesis de nuevos fármacos (OMS, 1979). Se estima que un 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional como medida primaria de salud, por lo que ha aumentado el interés científico en analizar las propiedades atribuidas a las especies de plantas utilizadas. Las plantas medicinales son fuentes importantes para la producción de metabolitos secundarios utilizados ampliamente en la industria como parte de medicamentos, aditivos alimenticios, pigmentos, insecticidas, cosméticos y perfumes (Mulabagal y Tsay, 2004). En la búsqueda de alternativas biotecnológicas para la producción de compuestos de interés a partir de especies vegetales, se encuentra el cultivo de tejidos vegetales (CTV) esta es una herramienta biotecnológica que nos permite manipular células y tejidos vegetales. Dentro del CTV el cultivo de células en suspensión es una técnica que ofrece un gran potencial para la producción de compuestos con diversas actividades biológicas con importantes aplicaciones en la industria química y farmacéutica, a partir de la cual se han obtenido grandes beneficios en la obtención de compuestos de interés comercial como lo es el taxol, entre otros (Szabados *et al.*, 1991).

Lopezia racemosa Cav., es utilizada en la medicina tradicional para aliviar dolores de estómago, úlceras, infecciones en la piel y sarampión (Biblioteca virtual de la medicina mexicana UNAM). Diversos estudios demuestran que los extractos de esta planta presentan actividad antiinflamatoria y citotóxica (Salinas *et al.*, 2014; Navarro-Cruz, 2011), además de que a partir de estos se han logrado identificar compuestos como el 6-O-palmitoil- β -D-glucopiranosil campesterol (LR1), 6-O-palmitoil- β -D-glucósido- β -sitosterol (LR2), (23*R*)-2 α ,3 β ,23,28-tetrahidroxi-14,15-dehidrocampesterol (LR3) y feruloato de heptilo, los cuales han mostrado tener actividad antiinflamatoria y citotóxica (Moreno-Anzures *et al.*, 2017). También se ha evaluado la producción de metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria en callos, plantas micropropagadas, así como en cultivos de células en suspensión y

cultivo de raíces pilosas (Salinas et al, 2014, Navarro-Cruz 2011, Moreno-Anzúrez 2012). En el trabajo realizado por Moreno-Anzúrez (2012) se obtuvieron diversas líneas de raíces pilosas con características y potencialidades distintas, entre las cuales se destaca la línea LRT3.1, pues a partir de esta línea se produjo callo friable después de 2 años de subcultivos continuos. Además, los extractos orgánicos de células en suspensión derivadas de callos friables de esta línea, mostraron una alta actividad antiinflamatoria y citotóxica, sin embargo, dejaban de crecer en corto tiempo. El presente trabajo reporta el establecimiento de cultivos de células en suspensión transformados derivados de la línea de raíces pilosas LRT3.1 que mantuvieron su capacidad de crecimiento mediante la adición del amortiguador de pH morfolinetansulfonato (MES); así mismo, se reporta el efecto del antioxidante ácido ascórbico a distintas concentraciones, sobre el crecimiento de éstas mismas células al evitar la oxidación observada previamente en los cultivos, además se reporta la adición de auxinas y citocininas a distintas concentraciones, con la finalidad promover su crecimiento. Finalmente se reportan los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento y producción de metabolitos con actividad antiinflamatoria y citotóxica realizada en las células en suspensión derivadas la línea LRT3.1 de raíces transformadas.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Plantas medicinales

México es un país con una gran riqueza biológica, posee una gran variedad de plantas con propiedades medicinales. Se encuentra posicionado con el 5to lugar en especies de plantas y se estima que existen alrededor de 7,000 especies con algún tipo de uso, sin embargo, hasta el momento se han registrado aproximadamente 6,000 especies con atributos de tipo medicinal (Aguilar,2012; CONABIO, 1998). Con respecto a su flora Morelos se ubica en el décimo segundo lugar respecto a los estados de la república, presentando un 70% del total de especies (Bonilla-Barbosa y Villaseñor 2003). Se han registrado 3,845 especies de plantas de las cuales 293 presentan propiedades medicinales (Monroy-Ortiz y Monroy 2006), conferidas por metabolitos secundarios.

2.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios, son compuestos químicos que con frecuencia tienen una estructura relativamente compleja. Se derivan del metabolismo primario y para algunos de ellos, su distribución está restringida a ciertos grupos taxonómicos. Se ha reportado que algunos son indispensables para la supervivencia de las plantas, pero en muchos casos no se ha descubierto aun alguna función metabólica (Bourgaud *et al.*, 2001).

Los metabolitos secundarios tienen un gran valor desde el punto de vista social, económico y comercial, usados principalmente en la industria para la producción de insecticidas, colorantes, pigmentos naturales, saborizantes, aromatizantes y productos farmacéuticos (Mulabagal y Tsay, 2004).

Los metabolitos secundarios pueden clasificarse en base a su estructura química, composición (contienen o no nitrógeno), su solubilidad en diversos solventes o por la vía que se sintetizan.

2.2.1 Compuestos de origen fenólico

Los compuestos fenólicos, son sustancias que poseen un grupo fenol, es decir un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo. Existen decenas de miles de compuestos fenólicos con estructuras muy diversas: fenilpropanoides, polifenoles, cumarinas y flavonoides, entre otras. Se han identificado aproximadamente 4500 diferentes tipos de flavonoides y estos funcionan principalmente en la protección de las plantas contra la irradiación de UV-B, la mayoría de estos compuestos son clasificados como metabolitos secundarios en plantas. Estos compuestos se sintetizan principalmente de dos rutas metabólicas:

- La ruta del ácido shiquímico, la cual origina principalmente fenilpropanoides, lignanos y ligninas.
- La ruta del acetato, la cual produce fenoles simples, flavonoides y algunas quinonas.

2.2.2 Terpenos y esteroides

Este tipo de metabolitos, comprende un amplio grupo de compuestos que se caracterizan por estar formados de unidades pentacarbonadas ramificadas derivados del isopreno, los terpenos se clasifican según el número de átomos de carbono en su molécula en hemiterpenos (5 C), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), sesquiterpenos (25 C), triterpenos (30 C), tetraterpenos (40 C), respectivamente y politerpenos de mayor tamaño (Wagner y Elmadfa, 2003).

Los terpenoides se sintetizan a partir de metabolitos primarios mediante dos vías. La primera vía es la del ácido mevalónico (citosólica), donde tres moléculas de acetil-CoA se condensan y forman ácido mevalónico, el que a su vez por varias reacciones forma isopentenil difosfato (IPP). La otra vía es la del metileritritol fosfato (MEP), el que se forma a partir de gliceraldehido-3-fosfato y piruvato. El MEP es luego el precursor del dimetilalil difosfato (DMAPP). Éste último junto con el IPP son los precursores activos de la biosíntesis de los terpenos y sus reacciones están catalizadas por prenil transferasas, dando origen a prenil difosfatos como por

ejemplo el geranil difosfato (GPP). El GPP es precursor de los monoterpenos, y junto a una molécula de IPP, origina el farnesil difosfato (FPP), compuesto precursor de sesquiterpenos, triterpenos y esteroides. Posteriormente el FPP más una molécula de IPP dará origen al geranilgeranil difosfato (GGPP), precursor de diterpenos, tetraterpenos y politerpenos (Singh y Sharma, 2015).

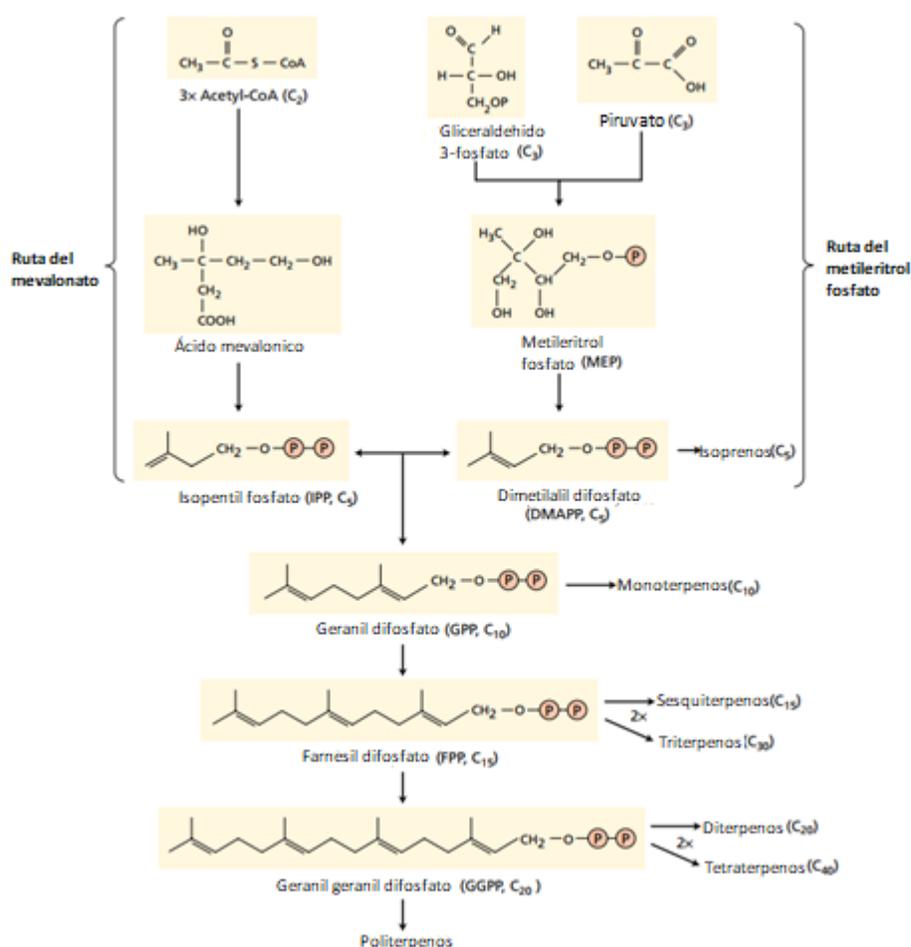


Figura 1. Ruta de biosíntesis de los terpenos (Taiz Y Zeiger, 2002)

2.2.3 Alcaloides

Los alcaloides comprenden el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, siendo compuestos orgánicos de origen cíclico que en su estructura presentan al menos un átomo de nitrógeno, derivado generalmente de aminoácidos (Bruneton, 1991). Se encuentran presentes en todos los órganos de la planta, pero mayormente en hojas, frutos, flores, semillas y raíz.

2.2.4 Importancia de los metabolitos secundarios

Debido a su gran actividad biológica los metabolitos secundarios han sido utilizados durante siglos en la medicina tradicional, por lo que hoy en día son altamente utilizados en la industria como productos farmacéuticos, cosméticos, productos químicos finos (Bourgaud *et al.*, 2001; Mulabagal y Tsay, 2004). La producción de metabolitos secundarios se ha llevado a cabo en cultivo en campo de plantas medicinales, sin embargo, a pesar de décadas de esfuerzo la producción de estos metabolitos no es suficiente debido a muchas limitaciones biológicas y biotecnológicas, en función de esto, diversas estrategias han sido empleadas buscando aumentar los valores de productividad de compuestos bioactivos en sistemas de cultivo de células y tejidos vegetales incluyendo la manipulación epigenética la elucidación de vías biosintéticas y la aplicación de técnicas de biología molecular, para el aumento y producción masiva de estos metabolitos secundarios (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

2.3 El cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales, es una herramienta biotecnológica basada en el principio de la totipotencialidad celular. Existen diversas técnicas que permiten establecer en condiciones asépticas y libres de microorganismos estructuras vegetales, células, tejidos, órganos y plantas en medios de cultivos nutritivos, bajo condiciones ambientales controladas (Street, 1977).

Dado la totipotencia de las células que la conforman y con una buena combinación de reguladores de crecimiento vegetal, estas tienen el potencial de regenerar una planta completa (Street, 1977; Gamborg, 2002) a este proceso de transformación de célula a órgano u planta se le conoce como diferenciación celular (Ferl y Paul, 2000). Las principales aplicaciones de las técnicas de cultivos de tejidos son: la micro propagación de especies vegetales, la producción de semillas sintéticas, el cultivo de raíces pilosas y el cultivo de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios (Chattopadhyay *et al.* 2002).

2.4 Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas son sustancias químicas que juegan un papel importante en el control del crecimiento de la planta, provocando respuestas fisiológicas y regulando así, casi en su totalidad el crecimiento vegetal. En la década de los 30 del siglo pasado surgió el estudio de los reguladores de crecimiento vegetal presente en las plantas como sustancias específicas para la formación de órganos, tejidos y células. Actualmente muchos de los estudios que se realizan con reguladores de crecimiento vegetal han servido para dilucidar la regulación de procesos como inducción de raíces y brotes (Marqués *et al.*, 2011). Los reguladores de crecimiento vegetal se clasifican principalmente en 5 grupos básicos de sistemas químicos dependiendo del origen y respuesta que provocan:

Tabla 1. Clase de regulador de crecimiento vegetal, función asociada y usos prácticos (Taiz y Zeiger., 2006)

Clasificación	Función	Usos prácticos
Auxinas	Elongación de brotes	Aumenta el enraizamiento y la formación de flores
Citocininas	Estimula la división y elongación celular	Prolonga la vida de almacenamiento de flores y verduras y estimule la iniciación de las yemas y el crecimiento de las raíces
Giberelinas	Estimula la división celular	Aumenta la longitud del tallo, aumenta el tamaño de la flor y la fruta
Etileno	Induce madurez	Inducir una maduración uniforme en frutas y verduras
Ácido abscísico	Dormancia vegetal	Induce dormancia de la semilla y la apertura de estomas

Dentro de esta clasificación, las auxinas y citocininas juegan un papel muy importante al regular procesos de crecimiento, elongación y división celular, desarrollo de las plantas, así como formación de callos y brotes (Gaspar *et al.*, 1996; Su *et al.*, 2011).

2.4.1 Auxinas

Las auxinas son fitohormonas que participan en diversos procesos de desarrollo de las plantas, se ha reportado que su presencia en altas cantidades induce a procesos activos de división celular, elongación y diferenciación celular (Vanneste y Friml, 2009), lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la inducción de elongación de tallos, en presencia de citocininas promueve la división celular en cultivos de callos y la formación de raíces adventicias en hojas y tallos cortados (Taiz y Zeiger, 2002).

2.4.2 Biosíntesis de auxinas

Las auxinas son producidas en las plantas a partir del catabolismo del triptófano, el ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más abundante y fisiológicamente más importante en el reino vegetal (Figura.2) (Taiz y Zeiger, 2006). Se han reportado tres rutas principales de síntesis de auxinas dependientes de triptófano.

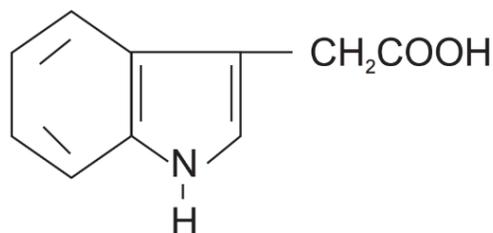


Figura 2. Estructura química del ácido indol-3-acético (Tomada de Aguilar-Piedras *et al.*, 2008)

La ruta de triptamina (TAM), es una ruta que juega un papel importante en la síntesis de auxinas, involucra una reacción de descarboxilación del triptófano a triptamina para originar indol-3-acetaldehído (IAAd), producido a través de una serie de

reacciones enzimáticas, este compuesto es oxidado por la IAA deshidrogenasa convirtiéndolo ácido indol-3-acético (Figura 3B). La ruta del ácido indol-3-piruvico (IPA), es la ruta más común dependiente de triptófano y estrechamente relacionada a la ruta TAM, esta involucra una reacción de desaminación para formar IPA, seguida de una reacción de descarboxilación para originar el 3 indol-acetaldehído (IAId), oxidado por la deshidrogenasa IAA (Figura 3C). A partir del ácido indol-3-acetronilo se origina la ruta IAN en la cual el triptófano es convertido en ácido indol-3-acetronilo y este en 3 -indol acetronitrilo para finalmente convertir IAN a ácido indol-3-acético (Figura. 3A) (Taiz y Zeiger, 2006).

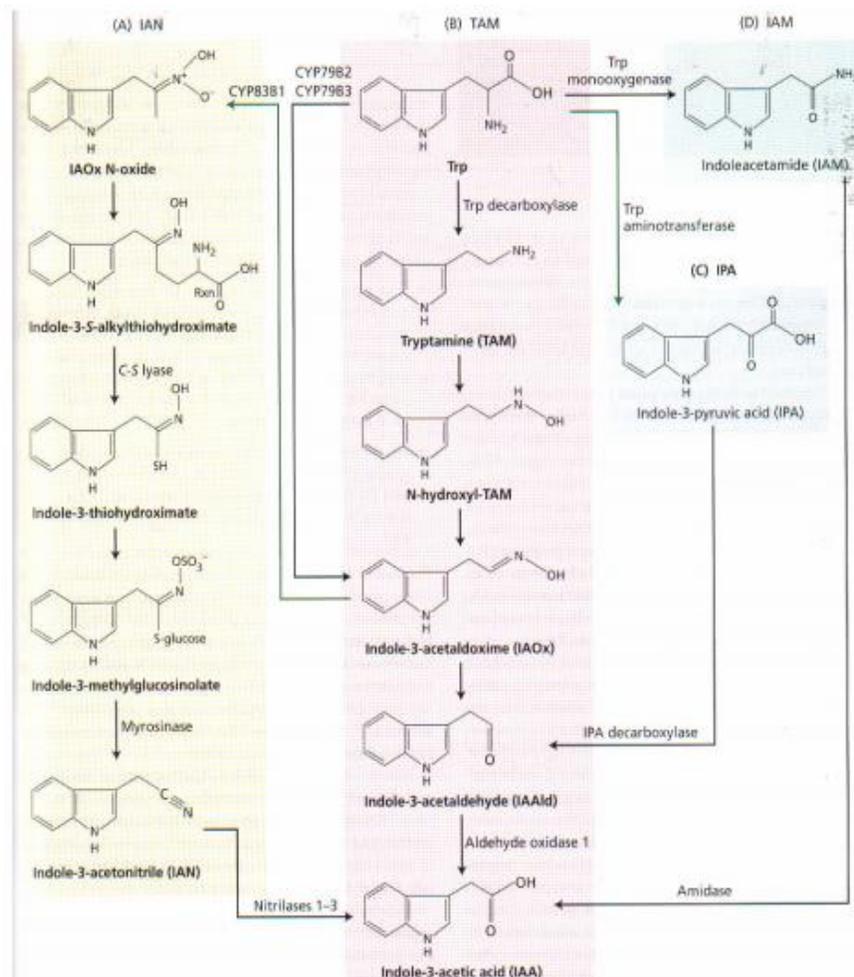


Figura 3. Biosíntesis de IAA en plantas (Tomada de Taiz y zeiger, 2006)

2.4.3 Citocininas

Las Citocininas son hormonas vegetales que regulan un gran número de procesos vitales en las plantas, son factores de estimulación de células vegetales, se ha reportado por Sakakibara y cols. (2006) que estos compuestos afectan a diversos procesos fisiológicos y del desarrollo de toda la planta en el que se incluyen la senescencia de la hoja, la movilización de nutrientes, la dominancia apical, la formación y actividad de meristemos del ápice caulinar, el desarrollo floral y la germinación de semillas (Taiz y Zeiger, 2006).

La primera citocinina en ser descubierta fue la kinetina, se ha reportado que este compuesto en presencia de auxinas induce la maduración de cloroplastos y la proliferación del cultivo en tejido parenquimático de tabaco (Stetler y Laetsch, 1965). La zeatina es la citocinina natural más abundante, principalmente se sintetiza en tejidos jóvenes o meristemáticos como ápices radiculares y yemas de tallo desde donde se transportan vía xilema hacia las hojas, para luego ser exportada a otros órganos de la planta (Fig. 4) (Taiz y Zeiger, 2006).

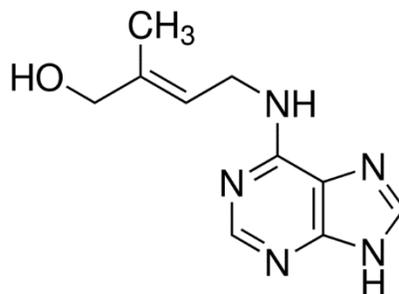


Figura 4. Estructura química de la zeatina

Además, existen algunas citocininas sintéticas utilizadas frecuentemente en técnicas de cultivo in vitro de tejidos vegetales y cultivos en suspensión como: la 6-bencilaminopurina (BAP).

2.5 Cultivo *in vitro* de callos

Un callo es un tejido formado por una masa amorfa surgida de la proliferación de células obtenido de un tejido u órgano vegetal diferenciado. Estas células presentan una proliferación continua, acelerada y una apariencia desorganizada. Cuando el interés de obtener callos es la producción de metabolitos secundarios la característica más importante es su disgregabilidad, es decir, que sea capaz de generar suspensiones celulares. Mediante la aplicación de RCV se pueden obtener callos de dos tipos: compacto o friable. El callo compacto con frecuencia es organogénico, mientras que el callo friable, se caracteriza por ser disgregable e indiferenciado, formando tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intracelulares (Ochoa *et al.*, 2012).

El cultivo *in vitro* de callos es un método ampliamente más usado para propagación de plantas induciendo su diferenciación para formar órganos o embriones, por un lado, o pasarse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión por otro lado (Calva, 2005).

2.6 Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio líquido en agitación constante, en donde las células se disgregan y continúan su crecimiento como cultivo en suspensión (Szabados *et al.*, 1991). Este tipo de cultivo es empleado para la obtención de metabolitos, estos pueden ser producidos bajo condiciones controladas y reproducibles.

Las suspensiones celulares pueden desarrollarse en cultivos cerrados (no entra ni sale medio de cultivo nuevo) o abiertos (entra medio nuevo y sale medio gastado con algunas células) (Wilson, 1980). En los cultivos cerrados el crecimiento de las suspensiones comprende varias fases: la fase de adaptación, la fase exponencial y la fase estacionaria (Szabados *et al.*, 1991).

Durante la fase estacionaria de las suspensiones celulares, es donde frecuentemente se da la acumulación de metabolitos secundarios (Bourgau *et al.*, 2001; Szabados *et al.*, 1991). Para el caso de metabolitos que están involucrados

en crecimiento, su acumulación está relacionada con la producción de biomasa y se da principalmente en la fase exponencial (Figura 5).

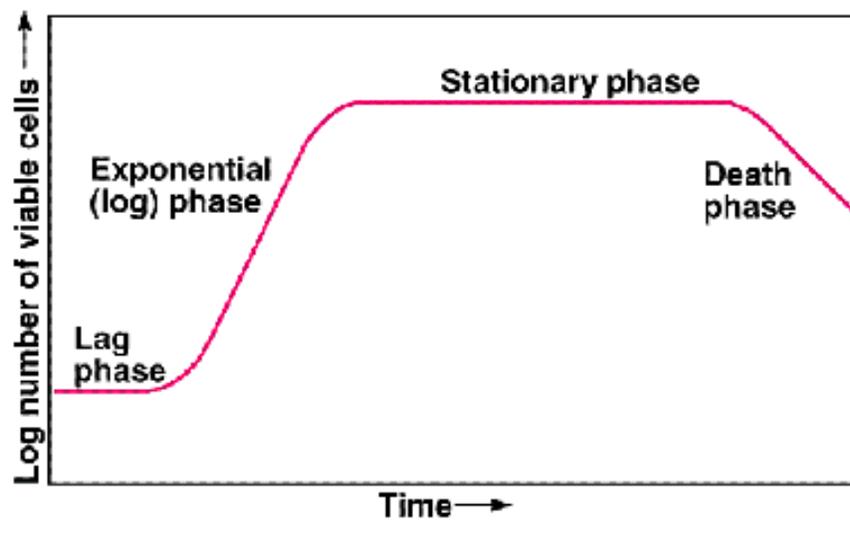


Figura 5. Curva de crecimiento típica, en la cual se relaciona el número de células en las diferentes fases (lag, exponencial, estacionaria y de muerte) con el tiempo de incubación, en cultivo cerrado.

2.7 Transformación genética de células vegetales

La transformación genética de plantas está dirigida a la producción de genotipos que expresen características de interés mediante la integración de segmentos de DNA al genoma vegetal, para proporcionarle algunas ventajas que naturalmente no presenta (Díaz y Chaparro-Giraldo 2012). Los métodos de transferencia de genes pueden ser: sistemas de transformación directa e indirecta (Sharma *et al.*, 2009).

- Sistema de transformación directa, ha desarrollado métodos como: electroporación, tratamiento con poli-etilenglicol, microinyección, liposomas y agentes químicos.
- Sistema de transformación indirecta, mediante el uso de *Agrobacterium* y algunos virus.
-

2.8 Transformación genética mediada por *Agrobacterium*

Las especies de *Agrobacterium* como *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* son fitopatógenos de plantas pertenecientes a la familia Rhizobiaceae, capaces de transformar células vegetales mediante la transferencia e integración de su material genético al genoma del hospedero. Estas bacterias son capaces de inducir la formación de tumores o formación de raíces pilosas mediante la integración de sus plásmidos inductores. *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* presentan un plásmido de origen extracromosomal Ti (inductor de tumor) para *A. tumefaciens* y Ri (inductor de raíces) para *A. rhizogenes*, este incluye un segmento conocido como T-DNA, contiene dos tipos de genes, los genes oncogénicos y los genes que codifican para la síntesis de opinas. El T-DNA está flanqueado por dos bordes, que son secuencias repetidas de 25 pares de bases, lo que permite transferir dicha secuencia de DNA que se encuentra entre los bordes (Hooykaas Y Schilperoot, 1992). Además, los plásmidos Ti y Ri contienen una región de virulencia (Región *vir*) fuera de la región T-DNA que a su vez contienen los genes *vir* que participan en el proceso de transferencia del T-DNA.

El proceso de transformación inicia cuando la proteína VirA, detecta compuestos de origen fenólico y monosacáridos como glucosa y galactosa liberados por la planta al sufrir una herida o daño, estos compuestos permiten la activación de VirA, una vez activada la proteína VirA transfiere su fosfato a la proteína VirG, la cual funciona como un factor transcripcional activando la expresión de los genes *vir*. Como resultado de la activación de los genes *vir*, las proteínas VirD1 y VirD2 reconocen las secuencias de los bordes y cortan, marcando el sitio de inicio y terminación de la cadena de T-DNA. VirD2 se une al extremo 5' de la cadena sencilla de T-DNA, formando un complejo VirD2: T-DNA. El locus *VirB* codifica para al menos 11 proteínas que conforman el sistema de secreción tipo IV (T4SS), además incluye a la proteína VirD4. En el proceso de transferencia de la cadena T-DNA, hacia la célula vegetal participan además un conjunto de proteínas (VirD5, VirE2, VirE3 y VirF), fundamentales para la transferencia del complejo VirD2:T-DNA hacia el núcleo (Figura.6) (Tzfira y Cytovzky, 2006). La integración de T-DNA dentro del

cromosoma de la planta esta mediada por la proteína VirD2 que contiene dominios con actividad para la recombinación y ligación (Tinland *et al.*, 1995), VirF hasta el momento no se encuentra bien caracterizado, sin embargo; se sabe que está implicado en la integración del T-DNA mediante la ubiquitinación de VirE2 y su degradación, durante la integración.

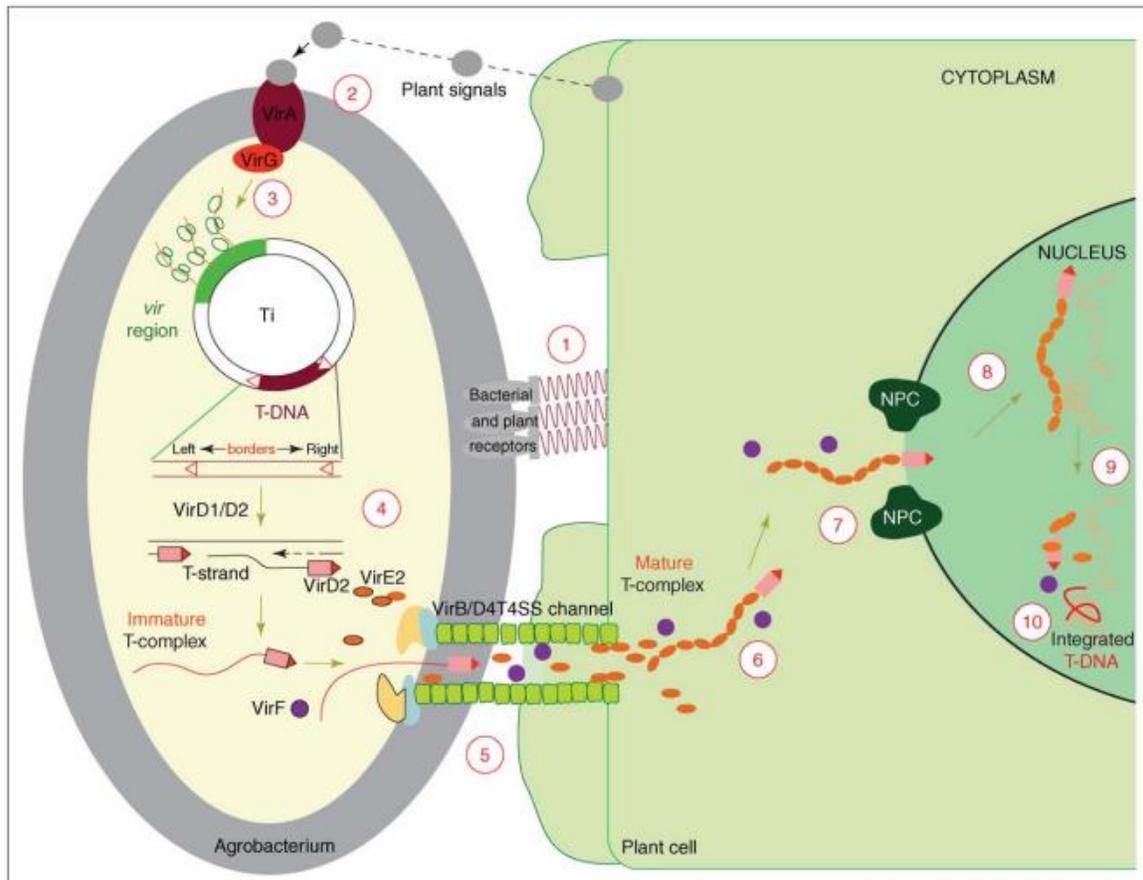


Figura 6. Modo de infección de *Agrobacterium* (Tomada de Tzfira y Cytovzky, 2006)

2.9 Cultivo de raíces pilosas

El cultivo de raíces pilosas ha sido investigado durante muchos años, debido a su gran importancia en el campo biotecnológico y al potencial para producir metabolitos que están presentes en las raíces. Se han reportado diversos estudios sobre la producción de metabolitos secundarios en cultivos de raíces pilosas obtenidos mediante *A. rhizogenes* y se ha observado que estas muestran una alta estabilidad genética y un rápido crecimiento. En muchos casos, en raíces transformadas por

Agrobacterium la producción de metabolitos secundarios es mayor a los niveles encontrados en raíces silvestres.

Se ha documentado la producción de compuestos de interés en algunos cultivos de raíces pilosas como lo son terpenos y fitoesteroles, usados ampliamente en la industria farmacéutica y cosmética.

2.10 *Lopezia racemosa* Cav.

Lopezia racemosa Cav. es una planta herbácea anual perteneciente a la familia Onagraceae, se distribuye desde México hasta Guatemala y El Salvador. En México, se encuentra en Durango, San Luis Potosí, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Querétaro, Michoacán, Nayarit, Veracruz, Puebla, Tlaxcala, México, Morelos, Guerrero, Oaxaca y Chiapas.



Figura 7. Distribución de la especie *Lopezia racemosa* en México

Esta mide aproximadamente de 50 a 150 cm de altura, se caracteriza por presentar tallos erectos que se arraigan en los nudos, cubiertos de pelos rígidos, florece principalmente de noviembre a abril, comúnmente conocida como hierba de cáncer, hierba de golpe, hierba de marrano, perilla, entre otros. (Figura.8), es utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de úlceras, sarampión, curación de granos, control de dolor de estómago, anginas (Biblioteca virtual de la medicina mexicana UNAM; Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007).



Figura 8. *Lopezia racemosa* Cav. tomado de CONABIO

2.10.2 Análisis fitoquímico y actividad farmacológica de *L. racemosa* Cav

A partir de extracto de diclorometano de *L. racemosa* de la planta silvestre completa, Salinas y cols. en 2014 aislaron e identificaron los compuestos 6-O-palmitoil- β -D-glucopiranosil campesterol (LR1) y 6-O-palmitoil- β -D-glucósido- β -sitosterol (LR2) y el β -sitosterol, el compuesto denominado LR1 también se aisló de callos tratados con reguladores de crecimiento, su actividad antiinflamatoria ha sido evaluada en el modelo de edema de oreja de ratón inducido por 13-acetato 2-O-tetradecanoilforbol, (TPA) mostrando un 57.14% de inhibición de la inflamación.

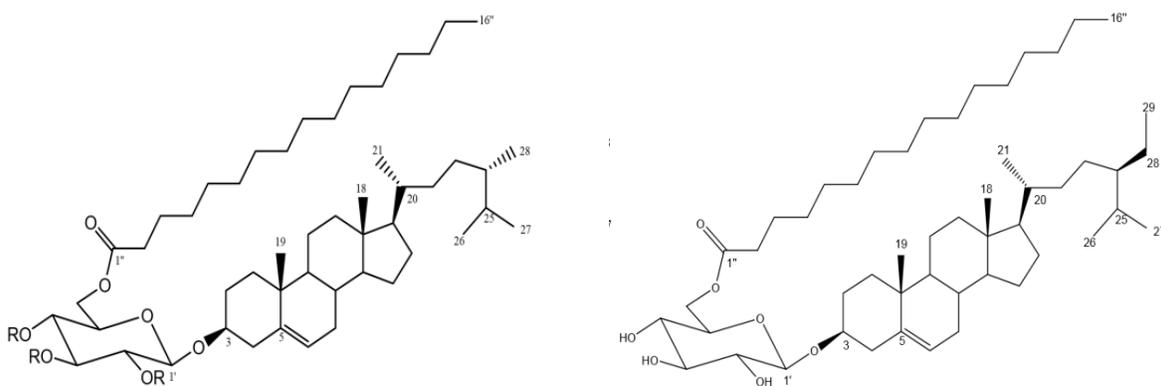


Figura 9. Estructura química de 1) 6-O-palmitoil- β -D-glucopiranosil campesterol (LR1) y 2) 6-O-palmitoil- β -D-glucósido- β -sitosterol (LR2)

Sánchez, (2010) realizó otros estudios en la misma planta, analizó el extracto hexánico y aisló e identificó el compuesto designado como feruloato de heptilo, el cual mostró actividad antiinflamatoria en el modelo de edema de oreja de ratón inducido por el TPA con el 63.97% de inhibición.

Navarro-Cruz (2011), reportó la detección de dos compuestos con importancia farmacológica el 6-O-caproil-3- β -D-glucósido de β -sitosterol y un glucósido de β -sitosterol a partir de extractos de plantas regeneradas mediante organogénesis directa e indirecta. Se ha reportado que estos compuestos poseen diversas funciones como la reducción del colesterol, inhibición de crecimiento de células cancerígenas y antiinflamatorias (Hung-Llamos et al. 2005).

Cruz-Paredes *et al.*, 2013, reportaron que los extractos obtenidos de la parte aérea de la planta silvestre, mostraron actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antiinflamatoria y citotóxica, sin embargo, los extractos no fueron evaluados mediante análisis fitoquímicos, por lo cual no se identificaron los compuestos que presentan dichas actividades.

En trabajos posteriores Moreno-Anzures *et al.*, (2017) identificaron a partir del extracto diclorometano:metanol (1:1 v/v) de diversas líneas de raíces transformadas un compuesto denominado (23*R*)-2 α , 3 β , 23, 28- tetrahidroxi -14, 15-dehidrocampesterol (LR3) que no había sido reportado previamente. También reportó que una fracción del extracto que contiene a este compuesto, tiene una mayor actividad antiinflamatoria y citotóxica que las reportadas previamente para esta especie, particularmente el cultivo de células en suspensión derivadas de la línea de raíces transformadas LRT3.1 mostró una alta actividad antiinflamatoria con una CI_{50} de 0.37 mg/oreja y también mostraron actividad citotóxica contra tres líneas de cáncer HeLa (carcinoma cervicouterino), HCT-15 (adenocarcinoma colorectal) y OVCAR (Carcinoma de ovario).

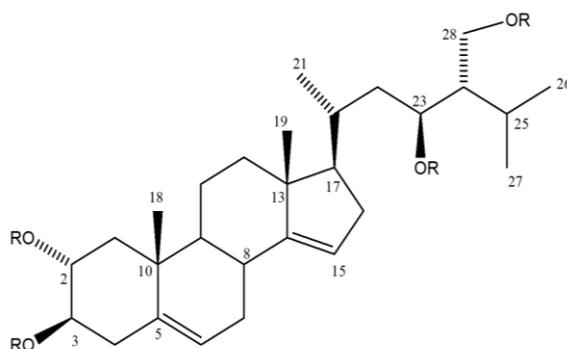


Figura 10. Estructura química de (23*R*)- 2 α , 3 β , 23, 28- tetrahidroxi- 14, 15-dehidrocampesterol (LR3)

2.10.1 Cultivo *in vitro* en *Lopezia racemosa*

En 2014, Salinas y colaboradores establecieron las condiciones para realizar cultivos *in vitro* de *L. racemosa*, la combinación de ácido naftalénacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) indujeron la formación de callos morfogénicos, brotes y raíces mientras que el tratamiento con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) con o sin BAP generó callos friables, en explantes de hipocótilo, segmentos nodales y hoja, bajo condiciones de fotoperiodo y oscuridad. Las líneas de callos obtenidas produjeron una menor cantidad del compuesto que las plantas silvestres, sin embargo, las plántulas germinadas *in vitro* mostraron una mayor producción.

Navarro-Cruz, (2011) reportó la micropropagación de *L. racemosa* por medio de dos vías: Organogénesis directa y organogénesis indirecta, a partir de segmentos nodales, el mejor tratamiento para la producción de brotes vía organogénesis directa fue con 2.0 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de BAP y 2.5 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de BAP para la formación de callos organogénicos. A partir de las plantas regeneradas se realizaron análisis químicos obteniendo como resultado la producción de 6-O-caproil-3- β -D-glucósido de β -sitosterol y β -sitosterol.

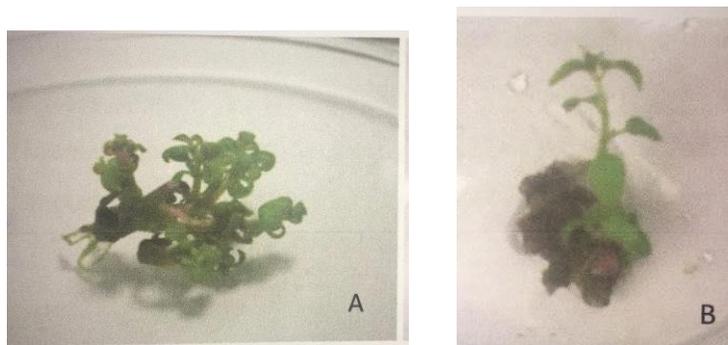


Figura 11. Organogénesis directa (A), organogénesis indirecta (B) de *L. racemosa* Cav.

Por otra parte, se ha reportado el establecimiento de cultivos de células en suspensión de *L. racemosa* generados en medio suplementado con 3.6 mg/L de 2,4-D y 0.25 mg/L de BAP a partir de los cuales se llevó a cabo una cinética de

crecimiento en el cual se evaluó la biomasa y otros parámetros (Moreno-Anzures, 2012).

En el siguiente trabajo se establecieron distintas líneas de raíces transformadas a partir de explantes de hojas de *L. racemosa* mediante *A. rhizogenes* cepa ATCC 15834/pTDT, se infectaron 113 explantes de los cuales 43 generaron raíces pilosas, es decir solo un 36% de los explantes mostraron respuesta positiva (Moreno-Anzures, 2012). Derivado de este trabajo García-Hernández (2016) realizó una cinética de crecimiento en cultivos de células en suspensión transformadas de la línea LRT 3.1 obteniendo una curva de los valores de pH a lo largo de la cinética donde observó grandes variaciones en el pH durante los primeros días. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.6 ± 0.1 , los resultados obtenidos después de 21 días en crecimiento mostraron que el pH se bajó llegando a un valor de 4.38, además los datos muestran que los cultivos de células en suspensión transformados de *L. racemosa* Cav. tienen un crecimiento atípico que podría ser causado por la baja de pH.

Bowell G. (1996), reportó que el pH puede afectar los cultivos en cuanto a su crecimiento, ya que el pH activa peroxidasas de la pared celular, causando problemas nutricionales, ya que a pH's muy ácidos las células no absorben eficientemente los nutrientes.

La adición de amortiguador de pH el ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES) a una concentración de 5 mM, mejoró la apariencia de las células de la línea LRT3.1 pero su tasa de crecimiento no fue evaluada, otro parámetro evaluado durante la cinética en el cultivo de células en suspensión transformados de *L. racemosa* Cav. fue la aplicación de antioxidantes ácido ascórbico y PVP, los resultados obtenidos muestran un efecto negativo añadiendo ácido ascórbico a concentraciones de 50 mg/L, 100 mg/L y 150 mg/L y en el caso de PVP también hubo un efecto negativo a concentraciones de 1.5 g/L y 2.5 g/L, ya que disminuyen considerablemente su viabilidad y promueven la formación de agregados celulares (García-Hernández, 2016).

CAPITULO 3. JUSTIFICACIÓN

Lopezia racemosa Cav. conocida comúnmente como "hierba de cancer" o "hierba de golpe" es utilizada en la medicina tradicional para tratar enfermedades como úlceras, sarampión y cáncer de estómago. Diversos estudios demuestran que los compuestos aislados de esta planta presentan actividad citotóxica y antiinflamatoria. Mediante alternativas biotecnológicas como el cultivo de callos y el cultivo de raíces transformadas se ha logrado establecer diversos protocolos para la producción de compuestos que presentan actividad antiinflamatoria y citotóxica como el 6-O-palmitoil- β -D-glucopiranosil campesterol (LR1), 6-O-palmitoil- β -D-glucósido- β -sitosterol (LR2), (23*R*)-2 α ,3 β ,23,28-tetrahidroxi-14,15-dehidrocampesterol (LR3) y β -sitosterol.

En comparación con los cultivos de raíces transformadas, los cultivos de las células en suspensión generados a partir de raíces transformadas, son una buena estrategia que ofrece un gran potencial para la producción de metabolitos de interés debido no solo a su estabilidad genética y a su rápido crecimiento en medio libre de fitohormonas, sino a que son de más fáciles de cultivar y escalar.

Dado que se ha reportado que los compuestos aislados de *L. racemosa* Cav. presentan gran actividad antiinflamatoria y citotóxica y con base en el trabajo realizado por Moreno-Anzures (2017) y García Hernández (2016) se propuso el siguiente trabajo que consiste en establecer cultivos de células en suspensión transformados derivados de la línea de raíces pilosas LRT3.1 que mantuvieran su capacidad de crecimiento; para lo cual, se utilizó un amortiguador de pH (MES), un antioxidante (ácido ascórbico) a distintas concentraciones con el propósito de evitar la oxidación observada en los cultivos y mejorar su crecimiento y por otro lado, se adicionaron al medio de cultivo distintas concentraciones de auxinas y citocininas con la finalidad promover y mejorar su crecimiento. Finalmente se realizó una cinética de crecimiento de la línea LRT3.1 y se evaluó su tasa de crecimiento, su viabilidad celular y la producción de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica a diferentes tiempos en el transcurso de la cinética

CAPITULO 4. HIPOTESIS

La adición de ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES) y ácido ascórbico a distintas concentraciones, así como la adición de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BAP permitirá incrementar la tasa de crecimiento de las células en suspensión de la línea LRT3.1 de *L. racemosa* Cav. así como la actividad antiinflamatoria y citotóxica de los extractos de callos y células en suspensión.

CAPITULO 5. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones de cultivo de las células en suspensión de la línea LRT3.1 de *L. racemosa* Cav. que permitan incrementar su tasa de crecimiento, aumentar el rendimiento de sus extractos e incrementar la producción de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de BAP y 2,4 D a diferentes concentraciones sobre el crecimiento del cultivo callos y células en suspensión transformadas de la línea LRT 3.1 de *L. racemosa* Cav.
- Evaluar el efecto de MES y ácido ascórbico sobre el crecimiento del cultivo de células en suspensión transformadas de la línea LRT 3.1 de *L. racemosa* Cav.
- Realizar la cinética de crecimiento de los cultivos de células en suspensión transformadas de la línea LRT3.1 de *L. racemosa* Cav.
- Evaluar la producción de los compuestos obtenidos a partir de cultivos celulares de la línea LRT3.1 de *L. racemosa* Cav.

CAPITULO 6. METODOLOGÍA

6.1 Obtención del material vegetal

El material vegetal que se utilizó para este proyecto fue callo friable seleccionado y cultivado a partir de la línea LRT3.1 de raíces pilosas transformadas mediante la cepa ATTC 15834/pTDT de *Agrobacterium rhizogenes* (Moreno-Anzures, 2012). Estos fueron subcultivados en un medio de cultivo denominado MS/B5 que contienen las sales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con vitaminas del medio B5 (Gamborg, 1968) y libre de reguladores de crecimiento.

6.2 Medio de cultivo.

6.2.1 Medio MS/B5 semisólido

El medio MS/B5 semisólido fue utilizado para el mantenimiento de los callos obtenidos de las raíces pilosas, constituido del 100% de macro y micronutrientes MS, 100% vitaminas B5, myoinositol 100 mg/L y sacarosa 30 g/L. El pH fue ajustado a 5.6 ± 0.1 , además de que se agregaron 3 g/L de Gelsan® y se esterilizó a 121 °C durante 21 minutos.

6.2.2 Medio MS/B5 líquido

Para el establecimiento de los cultivos de células en suspensión transformadas se utilizó medio MS /B5 líquido el cual se preparó con sales y vitaminas B5 con las mismas concentraciones usadas para el medio MS/B5 semisólido. El pH se ajustó a 5.6 ± 0.1 y se esterilizó a 121 °C durante 21 minutos.

6.3 Proliferación de biomasa

La línea de callos LRT 3.1 fue subcultivada en medio MS/B5 cada 20 días por 12 meses, a partir de esta línea se calculó el índice de crecimiento (IC) utilizando los datos de peso fresco y peso seco a partir de la siguiente formula (Ashraf *et al.*, 2015): $IC = (PF - PI) \div PI$

Donde:

PI= Peso Inicial

PF=Peso Final

6.4 Obtención y evaluación de extractos de los callos de la línea LRT 3.1

La biomasa que se obtuvo a partir de callos de la línea LRT 3.1 (5.57 kg) se dejó secar en la incubadora Binder a una temperatura de 30°C por 24 hr, para posteriormente llevarlas a maceración por 72 hr y por triplicado utilizando solventes: Diclorometano: Metanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$) 50/50 v/v en una proporción 1/10 con respecto a la biomasa. El extracto fue filtrado utilizando papel filtro Whatman No. 1 y concentrado en un rotaevaporador Büchi R-100.

Mediante cromatografía de capa fina (CCF) se llevó a cabo un monitoreo, utilizando un sistema de elución Hexano: isopropanol 70/30 v/v y empleando como revelador 4-hidroxibenzaldehído.

6.5 Efecto de diferentes concentraciones de BAP y 2,4-D en cultivo de callos derivados de raíces pilosas de la línea LRT 3.1.

Para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de auxinas y citocininas, en el índice de crecimiento de la línea LRT 3.1, se tomó 1 gr de callos derivados de esta línea de raíces pilosas y se sembró en medio semisólido MS/B5 (control) o se suplementaron con BAP y 2,4-D en 4 tratamientos, previamente reportados en la tesis de Licenciatura de Ilse Román Arellano (T1, T2, T3 y T4), estos mostraron un aumento constante en la formación de callo friable.

Tabla 2. Tratamientos empleados para la proliferación de biomasa de callos y células en suspensión de la línea LRT 3.1.

	BAP (mg/L)	2,4 D (mg/L)
T1	0	1.5
T2	0.05	0.5
T3	0.05	1.0
T4	0.1	1.0

6.6 Establecimiento de los cultivos de células en suspensión

Para realizar los cultivos de células en suspensión se utilizaron aproximadamente 2 gr de callo friable, derivados de raíces pilosas crecidos en medio MS/B5 semisólido, se tomaron y colocaron en frascos de 250 ml conteniendo 50 ml de medio MS/B5 líquido sin reguladores de crecimiento.

Enseguida estos fueron incubados en un agitador orbital (LabTech Mod. LSI-1005R), a 110 rpm y 25°C. Se dejaron proliferar durante un periodo de 20 días y se realizó un primer subcultivo utilizando pipetas desechables estériles (TPP®) de 25 ml y una bomba de succión (Pipet-Aid, Drummont Scientific Co. Broomall PA, USA). Para realizar el subcultivo se tomaron 20 ml de la suspensión celular y se inocularon en frascos de 250 ml conteniendo medio nuevo (50 ml).

6.7 Efecto de un amortiguador de pH (MES) y un antioxidante (ácido ascórbico) a diferentes concentraciones en cultivo de células en suspensión de *L. racemosa* Cav.

Para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de MES y ácido ascórbico en las células en suspensión, se tomó 1 gr de callos derivados de esta línea de raíces pilosas y se sembró en medio líquido MS/B5 (control) o se suplementaron con MES y ácido ascórbico en los diferentes tratamientos mostrados en la siguiente tabla.

Tabla 3. Tratamientos empleados para evaluar el efecto de MES y ácido ascórbico en cultivos de células en suspensión de la línea LRT 3.1

<i>Tratamiento</i>	Ácido ascórbico (mg/L)	MES (mM)
T1	0	0
T2	0	5
T3	0	10
T4	0	15
T5	12.5	0
T6	12.5	5
T7	12.5	10
T8	12.5	15
T9	25	0
T10	25	5
T11	25	10
T12	25	15
T13	50	0
T14	50	5
T15	50	10
T16	50	15

6.8 Cinética de crecimiento

Para comenzar la cinética de crecimiento, se inocularon 45 frascos con 10 ml de suspensión celular. Las suspensiones celulares que sirvieron de inóculo para la cinética se colocaron bajo agitación en un solo vaso de precipitados previamente esterilizado para lograr un inóculo más homogéneo. Durante la inoculación, la suspensión celular se mantuvo en agitación y de ahí se tomaron los 10 ml de suspensión celular que se mencionaron antes, inoculando cada uno de los frascos, los cuales contenían 40 ml de medio MS/B5. Todo este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

Después de la inoculación, se inició la determinación de los parámetros cinéticos, con la toma de los tres primeros frascos considerados como el tiempo cero (T0) y se les determinó todos los parámetros cinéticos pH, biomasa (peso fresco y seco). Posteriormente, se evaluó cada tercer día durante 42 días para un total de 12 puntos de muestreo. Para cada punto se tomaron 3 frascos. El incremento en biomasa se determinó mediante la medición del peso fresco y peso seco, también se calculó la velocidad específica de crecimiento mediante la siguiente fórmula:

$$\mu = x = \sqrt{\frac{1}{T} \ln \frac{x_2}{x_1}}$$

- μ = Velocidad específica de crecimiento
- T= Tiempo total en días de duración del cultivo
- x_2 = Peso seco máximo obtenido
- x_1 = Peso seco mínimo obtenido

6.9 Viabilidad celular

La viabilidad se observó mediante la técnica de fluoresceína, utilizando diacetato de fluoresceína (daf) (Wildholm, 1972). Para preparar la solución, se pesaron 5 mg de daf y se disolvieron en 1 mL de acetona, almacenándose a 4°C. Una alícuota de 0.1 mL del stock se adicionará a 5 mL de agua desionizada. Posteriormente, se tomaron 500 µL de esta última dilución y se mezcló con 500 µL de la suspensión celular, se dejó reposar 1 min, después se tomaron 50 µL de esta suspensión y se colocaron en un portaobjetos para ser observado al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E 400, Super high pressure mercury lamp, Modelo HB-10103AF) y el número de células viables se contó y se expresó en porcentaje. Se tomaron fotografías de cada punto antes y después de aplicar la fluoresceína.

6.10 Determinación de consumo de carbohidratos

La cuantificación de sacarosa, fructosa y glucosa en el medio de cultivo se realizó mediante CLAR acoplado un detector de índice de refracción. Para lo que se utilizó, una columna del tipo amino (NH₂) de la marca Waters. Las condiciones para las determinaciones fueron: fase móvil de acetonitrilo/agua (80:20) a un flujo de operación de 1ml/min a 30°C.

6.8 Preparación de extractos y cuantificación de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica.

Al término de la cinética de crecimiento, cada una de las muestras de biomasa seca fueron sometidas a extracción por maceración durante 72 horas con hexano: diclorometano 1:1 (v/v) en una proporción 1:10 (p/v) con respecto al peso seco de la muestra por triplicado. La solución fue recuperada por filtración y evaporada hasta sequedad. Los extractos generados fueron analizados mediante cromatografía en capa fina (CCF), en un sistema de elución 95:5 diclorometano:metanol y revelada con ácido sulfúrico.

6.9 Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Para el bioensayo se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 de 25 a 30 g, de entre siete a diez semanas de vida, mantenidos en condiciones estándar de laboratorio de acuerdo con las regulaciones establecidas en la NOM-062-ZOO-1999 y las guías internacionales de cuidado y uso de animales de experimentación.

Se usaron 4 grupos de 4 animales/grupo a los cuales se les administró en ambos lados de la oreja derecha el 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA, 2.5 µg mL⁻¹ en etanol). Los extractos CH₂Cl₂:CH₃OH provenientes de callos y células en suspensión derivadas de la línea de raíces pilosas LRT 3.1 y el fármaco de referencia 1 mg (indometacina) fueron diluidos en disolventes adecuados y se administraron después de la aplicación de TPA. Por otra parte, la oreja izquierda se empleó como control. Transcurridas 4 h se sacrificaron los animales para posteriormente obtener muestra de cada pabellón auricular mediante un sacabocado (6 mm de diámetro).

La actividad se evaluó como diferencia el peso de la oreja en miligramos, entre la izquierda y la derecha, el porcentaje de inhibición se resolvió como:

Inhibición (%) = (Diferencia de grupo control (Vehículo) – Tratamiento grupo/Control) x 100

6.10 Evaluación de la actividad citotóxica

Las líneas celulares de cáncer cervical CaSki y A549 se cultivaron en placas de 96 pozos, con una densidad celular de 6,500 células por pozo, y se expusieron durante 72 horas a diferentes concentraciones de las fracciones correspondiente a los callos y a las células, y se empleó podofilotoxina como control positivo de citotoxicidad.

Tanto los extractos como la podofilotoxina se disolvieron en DMSO a una concentración de 4 mg/mL y se diluyeron con DMSO al 10% para obtener las siguientes concentraciones ensayadas: 0, 0.00064, 0.0032, 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10 µg/mL.

Las placas conteniendo las células y las fracciones o el control podofilotoxina se cultivaron a 37°C y a 5% de CO₂. La viabilidad de las células se determinó con el

ensayo colorimétrico de Sulforodamina B, el cual estima el número de células indirectamente por tinción de la proteína celular total con el colorante Sulforodamina B (SRB).

Después del tiempo de tratamiento, se decantó el medio de los pozos y las células se fijaron con 100 μ L de ácido tricloroacético al 30% frío por 30 minutos a 4°C. Enseguida las células se lavaron 4 veces con agua corriente fría, y fueron teñidas con Sulforodamina B al 0.4% (disuelto en ácido acético al 1%) por 30 minutos, luego fueron lavadas 4 veces con ácido acético al 1% para retirar el colorante excedente no enlazado. Posteriormente, las placas con células teñidas se dejaron secar con aire del ambiente, resguardadas del polvo; una vez secas, el colorante se solubilizó con 200 μ L de Tris-base 10 mM (pH 10) por 30 min en un agitador orbital de placas a 50 rpm. La densidad óptica (D.O.) de cada pozo se midió espectrofotométricamente a 490 nm en un lector de ELISA automatizado. Los experimentos se realizarán por triplicado; los resultados obtenidos se analizaron en un programa estadístico para determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) mediante análisis de regresión.

El porcentaje de sobrevivencia celular fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sobrevivencia} = \frac{D.O. \text{ de células tratadas}}{D.O. \text{ de células control}} \times 100$$

Se graficó el porcentaje de sobrevivencia de las células tratadas con las fracciones 1 y 2, así como del compuesto de control positivo de citotoxicidad contra las diferentes concentraciones evaluadas, de lo cual se obtuvo la ecuación de la recta ($y=mx+b$), donde y es el porcentaje de sobrevivencia y x es la concentración. Considerando un 50% de sobrevivencia ($y=50$), el valor de CI₅₀ se obtuvo mediante la ecuación siguiente:

$$CI_{50} = \frac{50 - b}{m}$$

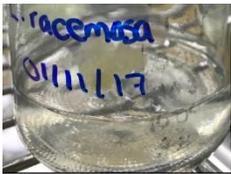
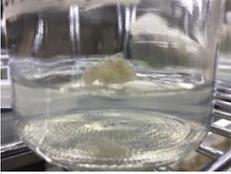
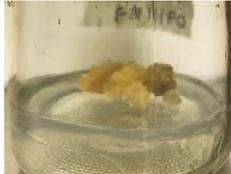
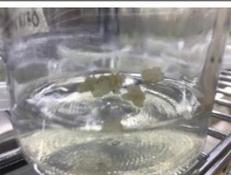
CAPITULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación del efecto de BAP y 2,4 D a diferentes concentraciones.

7.1.1 Evaluación visual

Los resultados obtenidos después de 30 días de crecimiento se muestran en la siguiente tabla 4.

Tabla 4. Evaluación de los tratamientos mediante parámetros visuales empleados para la selección del mejor tratamiento para un crecimiento rápido y efectivo.

Tratamiento BAP/2,4-D	Parámetros visuales				
	Color de callo	Aspecto	Tamaño	Día 1	Día 30
Control 0/0	Blanquecino	Friables y ligeramente hidratado	Mayor a 3 cm		
T1 0/1.5	Amarillento y un 20% fenolizado	Friables y ligeramente hidratado	Mayor a 3 cm		
T2 0.5/0.5	Amarillento Sin fenolización	Friables y ligeramente deshidratado	Mayor a 3 cm		
T3 0.5/1.0	Amarillento y un 10 % fenolizado	Friables y ligeramente hidratado	Mayor a 3 cm		
T4 0.1/1.0	Amarillento Y un 10% fenolizado	Friables y ligeramente deshidratado	Mayor a 3 cm		

La tabla 4. Muestra los parámetros visuales de los callos de la línea LRT 3.1 de los tratamientos evaluados con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, los resultados muestran similitud entre los tratamientos y el control, en la coloración, aspecto y tamaño.

El tratamiento 4, la combinación de 0.1 mg/L de BAP y 1.0 mg/L de 2,4-D, favorece la producción de biomasa ya que esta se duplica en comparación con el control (Tabla 4), esto probablemente se deba a que la combinación de estas fitohormonas a las concentraciones empleadas, inducen en mayor medida a los procesos activos de división, elongación y diferenciación celular en estos cultivos tal como se ha reportado previamente (Taiz y Zeiger, 2002; Vanneste y Friml, 2009)

7.1.2 Evaluación del aumento de biomasa: Índice de crecimiento

Como se mencionó previamente, el índice de crecimiento se determinó a través del peso fresco y peso seco (g/frasco), de cada tratamiento de los callos derivados de raíces pilosas de la línea LRT 3.1, 30 días después de sub-cultivarse. Según Pedroza *et al.* (1997) este es un índice de eficiencia que expresa el crecimiento en términos de una tasa de incremento en biomasa, por unidad de peso y tiempo; lo que representa la eficiencia del tejido vegetal al dividirse y multiplicar su biomasa celular.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5. Puede observarse que los tratamientos T3 (IC=1.7916) y T4 (IC=2.3191) muestran un índice de crecimiento mayor respecto a los tratamientos 1 (IC=1.3045) y 2 (IC=1.7694) mientras que el control (IC=1.327) muestra un resultado similar al tratamiento 1.

Tabla 5. Índice de crecimiento, peso fresco y peso seco de cada tratamiento de callos derivados de la línea LRT 3.1

TRATAMIENTO BAP/2,4-D	PESO FRESCO INICIAL (gr)	PESO SECO INICIAL (gr)	PESO FRESCO FINAL (gr)	PESO SECO FINAL (gr)	IC PESO FRESCO	IC PESO SECO
CONTROL	1	.0322	4.1013	0.0796	3.0013	1.4720
<i>(0/0)</i>	1	.0324	4.0817	0.0751	3.0817	1.3322
	1	.0321	4.0617	0.0701	3.0617	1.1770
T1 (0/1.5)	1	.0312	2.3914	0.0583	1.3914	0.8626
	1	.0314	3.5901	0.0788	2.5901	1.5175
	1	.0313	3.1083	0.0793	2.1083	1.5335
T2 (0.5/0.5)	1	.0308	4.1714	0.0861	3.1714	1.7954
	1	.0309	4.2892	0.0859	3.2892	1.7889
	1	.0307	4.0951	0.0839	3.0951	1.7240
T3 (0.5/1.0)	1	.0313	4.0742	0.0865	3.0742	1.7724
	1	.0311	3.1992	0.0817	2.1992	1.6185
	1	.0312	3.8674	0.0931	2.8674	1.9839
T4 (0.1/1.0)	1	.0306	4.243	0.0985	3.243	2.2189
	1	.0307	4.7028	0.1076	3.7028	2.5163
	1	.0305	4.1687	0.0986	3.2687	2.2222

El gráfico 1. Muestra el peso seco (a) y el índice de crecimiento (b) de la biomasa obtenida a partir de callos derivados de raíces pilosas de la línea LRT 3.1. Los resultados muestran variabilidad en el peso fresco, peso seco y los índices de crecimiento de cada uno de los tratamientos.

Comparativamente los tratamientos T3 y T4 mostraron una mayor cantidad de biomasa (peso seco) en los gráficos de índice de crecimiento (b), esta observación fue diferente con respecto al patrón de crecimiento del tratamiento control y los tratamientos T1 y T2 donde la producción de biomasa en peso seco fue menor.

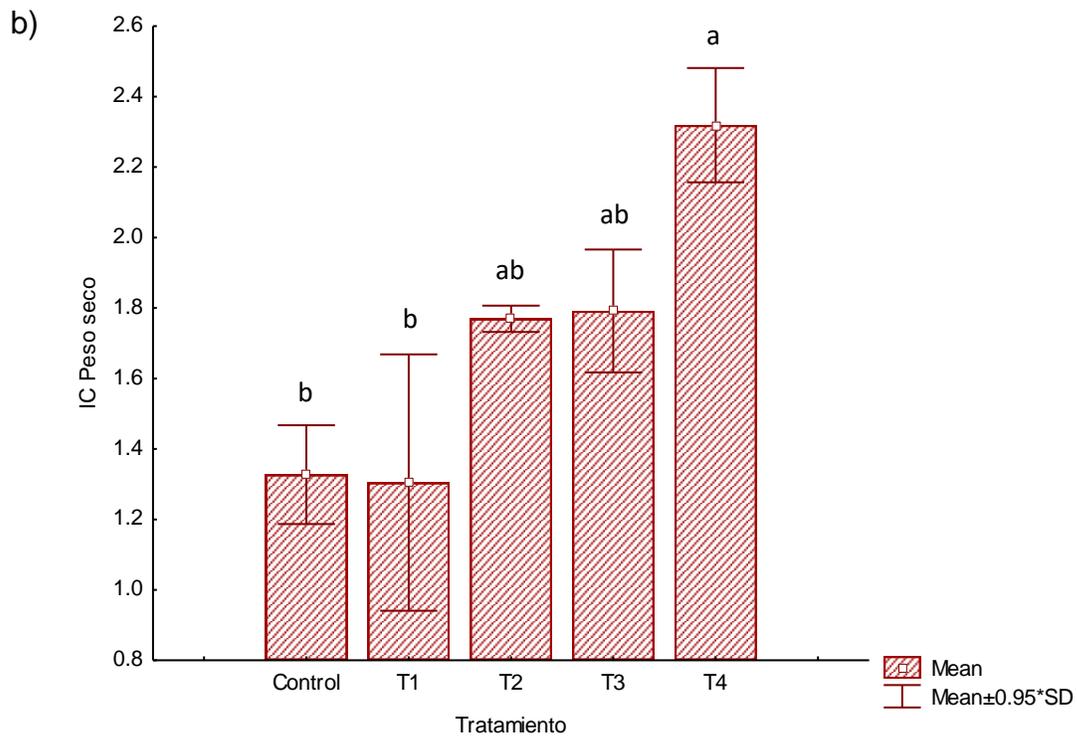
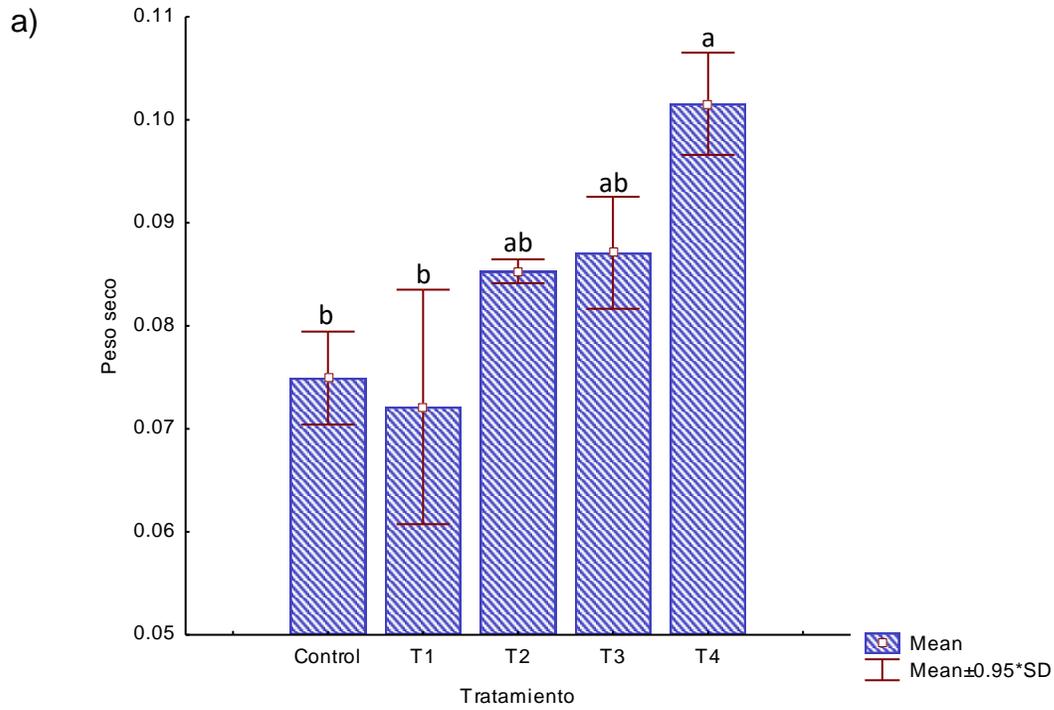


Gráfico 1. Grafica de peso seco (a) e índice de crecimiento (b) de callos derivados de raíces pilosas de la línea LRT 3.1. Las barras representan la media \pm SD. El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre el control y el tratamiento 4 ($P < 0.01$ *tukey post hoc*, $n=3$).

Al comparar estos resultados con los obtenidos para el caso de callos de *Melastoma malabathricum*, Keng y colaboradores en el 2008, reportan que al adicionar concentraciones elevadas de la auxina 2,4-D (4 a 10 mg/L) en el medio de cultivo reduce la formación y crecimiento de callos, sin embargo, concentraciones bajas de esta auxina (.1 a 2 mg/L) estimulan su crecimiento. En otro estudio se evalúa concentración de 2,4-D a 0.5 mg/L en cultivo de callos de *Securinega suffruticosa* y observan que la biomasa obtenida con este tratamiento estimula el crecimiento más del doble (471 %), en comparación con su control (218%) (*Raj et al.*, 2015). Además de otro estudio llevado a cabo en pulpa de manzana, donde logran la obtención de callos friables tratando los explantes con 1 mg/L de 2,4 D y 0.1 mg/L de BAP.

De acuerdo a lo reportado y como puede apreciarse en las figuras previas, de cultivo de callos sometidas al tratamiento 4, este presentó un índice de crecimiento mayor en comparación con el control, por lo cual este tratamiento fue utilizado para experimentos subsiguientes.

7.2 Evaluación del efecto de MES y ácido ascórbico sobre el crecimiento del cultivo de células en suspensión.

Para realizar la evaluación del amortiguador de pH (MES) y antioxidante (ácido ascórbico), se utilizaron nuevas suspensiones a partir de callos friables de *L. racemosa* Cav. Se evaluaron diferentes concentraciones de MES (5, 10 y 15 mM) y ácido ascórbico (12.5, 25 y 50 mg/L) y un control que no contenía MES ni ácido ascórbico.

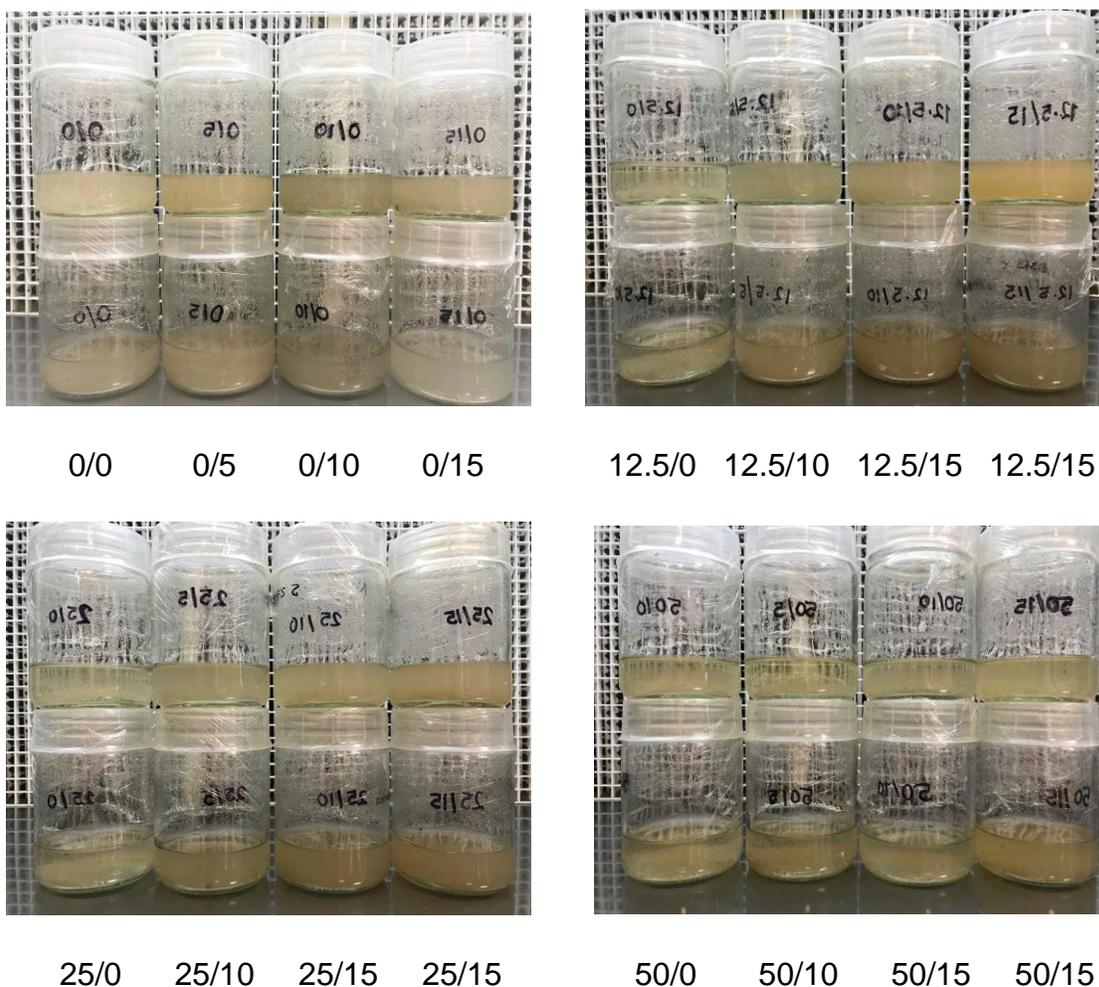
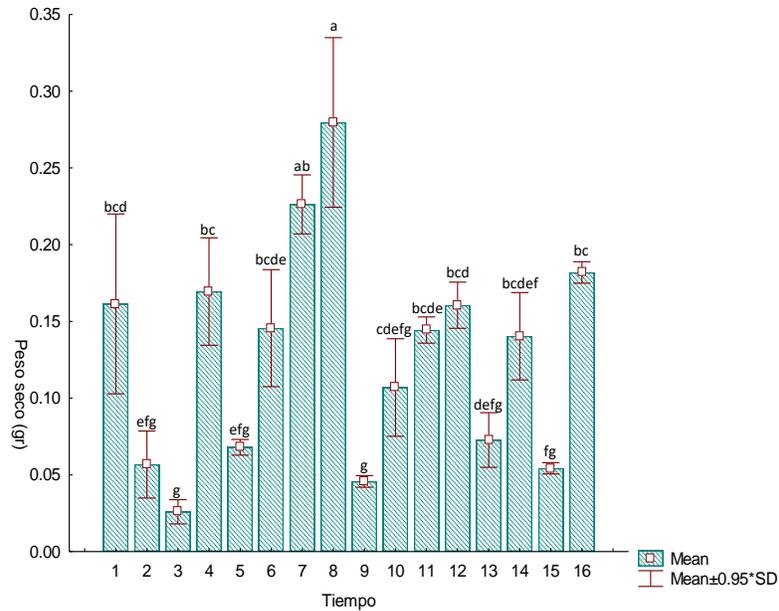


Figura 12. Células en suspensión de *L. racemosa* Cav. tratadas con diferentes concentraciones de MES y ácido ascórbico.

En los 16 tratamientos se determinó el crecimiento en base a peso seco y variación de pH, durante un periodo de 30 días. En los resultados obtenidos que se presentan

a continuación solo se muestra el crecimiento con base a peso seco a) ya que se considera más confiable gráfico 2.

a)



b)

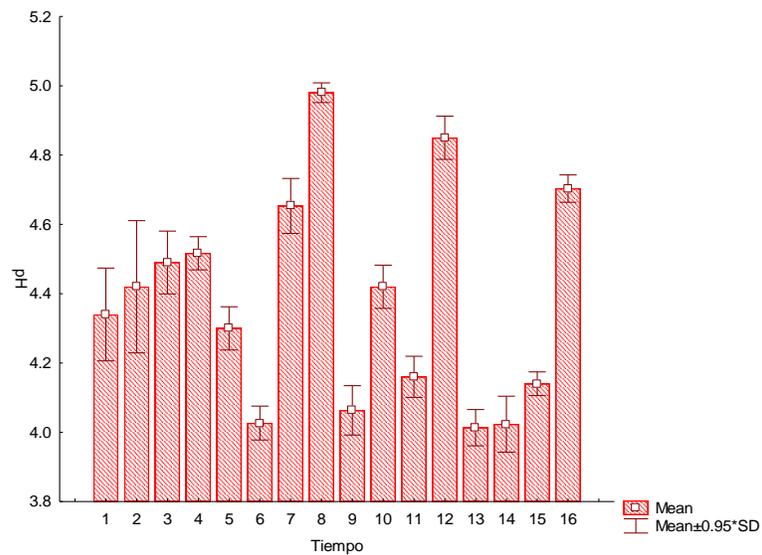


Gráfico 2. Crecimiento en base a peso seco y variación de pH de los 16 diferentes tratamientos, evaluando el efecto de MES y ácido ascórbico, Las barras representan la media \pm SD. El análisis estadístico muestra diferencias significativas (a) ($P < 0.05$, $t=30$ días, $n=3$ tukey HDS).

Mediante un análisis de varianza y la prueba de Tukey (*Tukey HDS*, $P < 0.05\%$), se observó que los tratamientos que presentaron un mejor efecto sobre el índice de crecimiento en base a peso seco y variación pH, fueron el tratamiento que contiene 12.5 mg/L de ácido ascórbico y 15 mM de MES y aquel que contiene 12.5 mg/L de ácido ascórbico y 10 mM de MES, asignados con la letra (a) y (ab) según la tabla 5, mostrando diferencias significativas comparados con los 16 tratamientos.

Tabla 5. Análisis de Varianza y prueba de tukey-HDS, del aumento en biomasa de los 16 tratamientos.

Tratamiento	Crecimiento en peso seco	Tukey-HDS
T1	0.161400	bcd
T2	0.056767	efg
T3	0.025957	g
T4	0.169467	bc
T5	0.067967	efg
T6	0.145600	bcde
T7	0.226233	ab
T8	0.279633	a
T9	0.045733	g
T10	0.106933	cdefg
T11	0.144367	bcde
T12	0.160500	bcd
T13	0.072733	defg
T14	0.140333	bcdef
T15	0.054267	fg
T16	0.181867	bc

Comparando estos resultados con los reportados por García-Hernández, 2016 quien observó que al adicionar ácido ascórbico a las suspensiones celulares de la línea LRT3.1 de *L. racemosa* Cav. a concentraciones de 100 y 150 mg/L, éstas mostraron un efecto deletéreo en el porcentaje de viabilidad celular hasta en un 80%, además de que promueven la formación de agregados celulares.

En otro estudio Arias-Zavala en 2008 observó que al adicionar una concentración de 0.5 mg/L de ácido ascórbico a las suspensiones celulares de *Caléndula officinalis* éstas mostraron un efecto positivo en el porcentaje de viabilidad celular además de una mayor proliferación y aumento de biomasa. Es importante mencionar que Arias-Zavala empleó concentraciones muy bajas de este antioxidante, en comparación con lo utilizado por García-Hernández.

Park *et al.* en el 2000, reportan que la fenolización es uno de los problemas que más comúnmente se presentan en el cultivo in vitro. Esta, es la liberación de compuestos fenólicos por los tejidos y la consecuente oxidación del medio de cultivo, aun en medios líquidos en los cuales es más fácil y rápido diluir los productos tóxicos. Estos compuestos impiden el crecimiento y desarrollo de los propios tejidos vegetales (Pierik, 1990).

De acuerdo a lo reportado y como puede apreciarse en las figuras previas, el tratamiento 8 en comparación con el resto de los 16 tratamientos, mostró el mayor aumento de biomasa, por lo cual se utilizó para llevar a cabo la cinética de crecimiento.

7.3 Cinética de crecimiento de células en suspensión.

7.3.1 Determinación del crecimiento celular

Se montó la cinética de crecimiento en medio MS/B5 suplementado con 0.1 mg/L de BAP, 1.0 mg/L de 2,4-D, 12.5 mg/L de ácido ascórbico y 15 mM de MES.

La concentración inicial del inóculo es un poco inferior a la concentración considerada como óptima y que fue reportada antes, lo cual se debió a limitaciones en la cantidad de biomasa disponible al momento de iniciar la cinética.

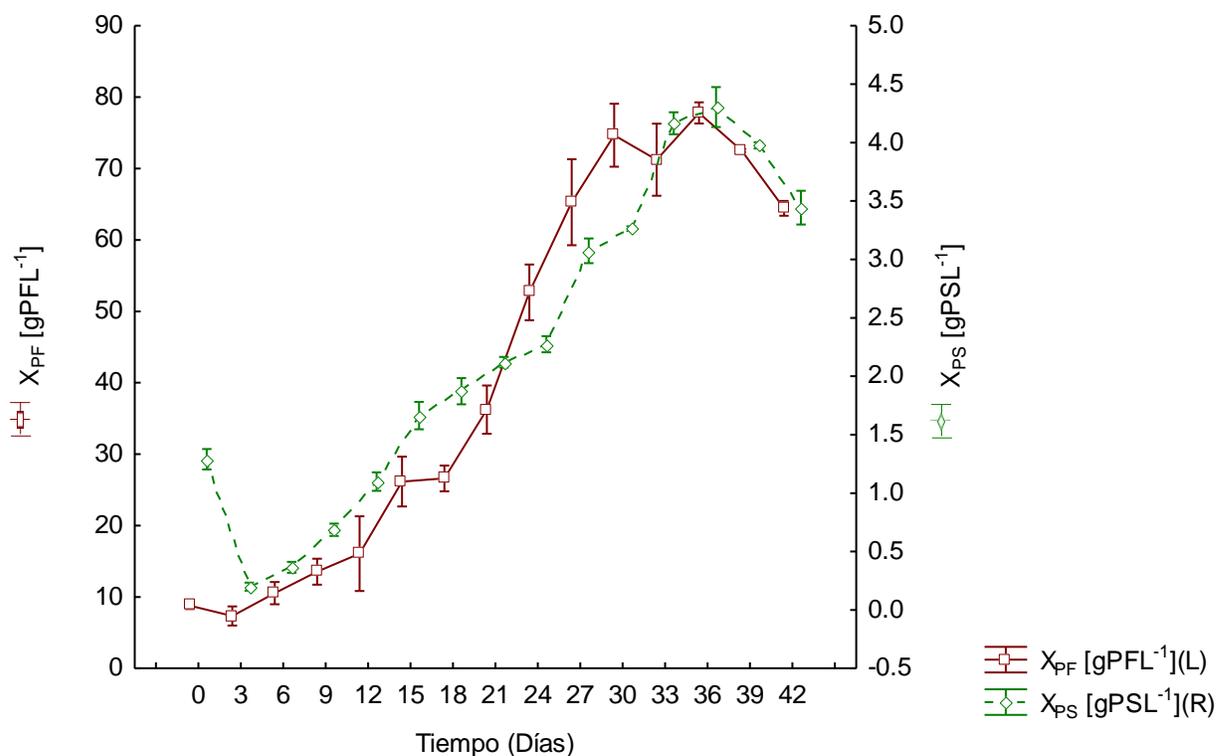


Gráfico 3. Curvas de crecimiento en base a peso fresco y peso seco del cultivo de células en suspensión de la línea LRT 3.1 de *Lopezia racemosa* Cav. Las barras representan la media \pm SD.

X_{PS} [gPSL⁻¹] (X_{PS} =Biomasa de peso seco, gramos de peso seco por litro de medio)

X_{PF} [gPFL⁻¹] (X_{PF} =Biomasa de peso fresco, gramos de peso fresco por litro de medio)

A lo largo de los 42 días de cultivo, se observó proliferación celular, registrando el peso fresco y peso seco de la biomasa en cada punto, lo cual nos permitió observar las diferentes fases de crecimiento de los cultivos de células en suspensión. Durante

los primeros 12 días de cultivo, las células comienzan a adecuar su maquinaria metabólica a las condiciones del medio de cultivo, pues al día 3 se observó una caída en la biomasa, seguido de un aumento paulatino hasta recuperarse al día 12, en esta fase de adaptación no se observó un incremento importante en la biomasa. La fase de crecimiento exponencial se mostró durante los días subsiguientes, del día 15 al 33, esta fase, se caracterizó por presentar un mayor incremento en la producción de biomasa, finalmente se observó la fase de disminución del crecimiento y finalmente la de muerte a partir del día 36 (Gráfico 3). La mayor cantidad de biomasa se determinó al día 36 con $4.49 X_{PS}$ [gPSL⁻¹].

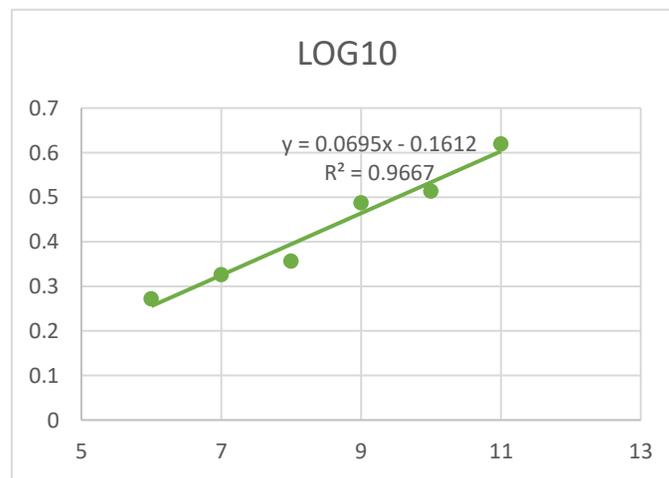


Gráfico 4. Fase de crecimiento exponencial en LOG₁₀, de los cultivos de células en suspensión de la línea LRT 3.1.

A partir de la Gráfico 4 se pudieron obtener los siguientes parámetros cinéticos que muestran el crecimiento de biomasa:

Velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}): $0.055 d^{-1}$

Tiempo de duplicación (t_d): 12.60 días

Estos valores son comparables con los de otras especies vegetales en cultivos de células vegetales, cuyas velocidades específicas de crecimiento se encuentran en el rango de $0,015 d^{-1}$ a $0,63 d^{-1}$ (tabla 5).

Tabla 5. Velocidades específicas máximas de crecimiento en cultivos celulares en suspensión de distintas especies vegetales.

<i>Línea celular</i>	$\mu_{\text{máx.}} (\text{d}^{-1})$	$t_d (\text{d})$	Referencia
<i>Taxus cuspidata</i>	0.05	13.86	(Son <i>et al.</i> , 2000)
<i>Lavandula vera</i>	0.16	4.16	(Pavlov <i>et al.</i> , 2005)
<i>Oenothera affinis</i>	0.50	1.38	(Domenburg <i>et al.</i> , 2008)
<i>Stevia rebaudiana</i>	0.63	1.10	(Mathur y Shekhawat, 2012)
<i>Waltheria americana</i>	0.08	8.59	(Mundo <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lopezia racemosa</i>	0.055	12.60	Este trabajo

μ (fase exponencial) = $\ln(x/x_0) / (t-t_0)$, x y x_0 son las concentraciones celulares en la fase exponencial en el tiempo t y t_0 , respectivamente. t_0 es el tiempo en el que inicia el crecimiento exponencial. μ se calculó como la pendiente de la recta obtenida en un gráfico de $\ln(x/x_0)$ vs. $(t-t_0)$.

Tiempo de Duplicación: $t_d = (\ln 2) / \mu$.

7.4 Viabilidad celular

La viabilidad celular se observó mediante la técnica de diacetato de fluoresceína (DAF), observando al microscopio y expresando el porcentaje en número de células vivas por unidad de área.

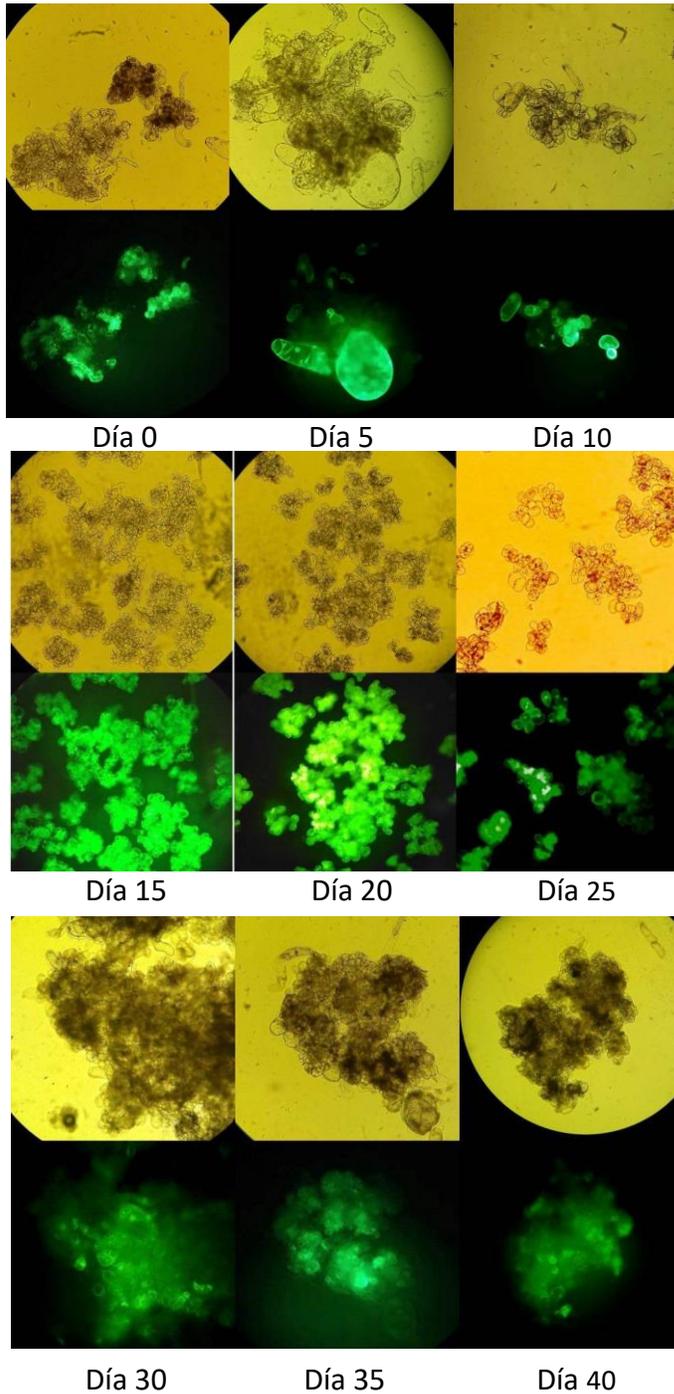


Figura 13. Viabilidad celular del cultivo de células en suspensión de *L. racemosa* A) Campo claro (Luz transmitida). B) Campo Oscuro (Fluorescencia). Objetivo 10X

Las células presentes en el cultivo de células en suspensión de *L. racemosa* muestran una morfología esférica además de que se observan micro agregados (Figura 13), estas formas se han reportado en otros cultivos de células vegetales como *Papaver somniferum* (Curtis y Emery, 1993), *Oryza sativa* y *Trichosanthes kirilowii* (McDonald *et al.*, 2001), *Uncaria tomentosa* (Trejo-Tapia *et al.*, 2005), *Solanum tuberosum* (Granger L., 2016), entre otros. Las células en suspensión tienden a formar agregados (40-200µm) de manera natural, esto es debido a la cohesividad de la pared celular que permite la comunicación célula- célula, que a su vez puede favorecer el transporte de intermediarios, necesario para la biosíntesis de metabolitos secundarios. Además, éstos generalmente promueven la organización celular y la diferenciación, que resulta en la mejora de la producción de metabolitos secundarios (Huang y McDonald, 2009).

Los resultados obtenidos de las pruebas de viabilidad se muestran en la siguiente tabla, en la cual podemos observar que se alcanzó el 98.23% de viabilidad al día 25, estos datos se correlacionan con los datos obtenidos en peso seco con base al aumento de biomasa.

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular durante la cinética de crecimiento

Tiempo	Porcentaje de viabilidad celular
0	90.76
5	86.96
10	89
15	93.2
20	95.1
25	98.23
30	97.74
35	97.43
40	93.16

Partiendo de estos resultados se generó una curva para observar el comportamiento que presentaron los datos.

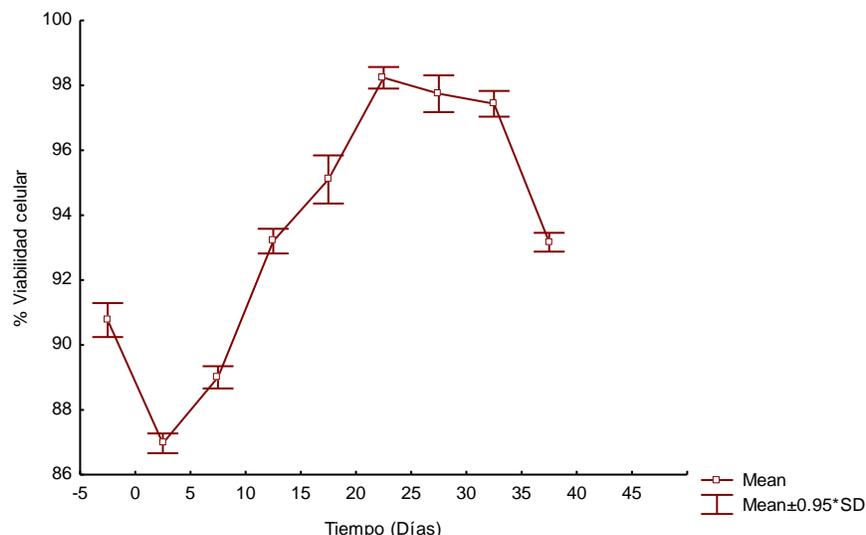


Gráfico 5. Porcentaje de viabilidad celular durante la cinética de crecimiento

En el gráfico 5 se puede observar el comportamiento del porcentaje de viabilidad celular en los cultivos de células en suspensión de *L. racemosa*, observamos que del día 0 al día 5 el porcentaje de viabilidad disminuye a 86.96% lo cual coincide con el decremento observado en las curvas de crecimiento; posteriormente el porcentaje va en aumento poco a poco hasta llegar a un punto máximo de 98% de viabilidad y al final de la cinética a partir del día 45 esta muestra una baja cayendo a 93.16%, esto lo podemos correlacionar con los resultados obtenidos en la curva de azúcares donde observamos que a partir del día 39 la fuente de Carbono esta casi agotada, por lo tanto los valores de biomasa y viabilidad celular también disminuyen. De acuerdo a este experimento los cultivos se mantienen viables durante más de un mes, Petersen en 2007 afirma que el incremento de la biosíntesis de metabolitos en una célula puede afectar directamente a la viabilidad celular, esto podría estar afectando también los cultivos celulares de *L. racemosa* pues, aunque mantienen una viabilidad alta, el crecimiento es más lento.

7.5 Evaluación de parámetros cinéticos consumo en el medio de cultivo.

7.5.1 Evaluación de pH en el medio de cultivo

En los valores de pH se pudo observar grandes variaciones durante los primeros días. En el gráfico 6 se muestra el comportamiento de pH de las suspensiones celulares. En el tiempo cero (T0), al iniciar la cinética se tenía un pH de 5.3 y se continuó acidificando durante los siguientes seis días llegando a un valor de 5.15 A partir del día 6 hubo un aumento constante de pH hasta el día 33, George, (1993), explica que a medida que el pH es menos ácido esta fuente de nitrógeno (NH_4^+) es más asimilable por los cultivos en suspensión y su consumo implica la liberación de protones H^+ al medio de cultivo lo que provoca una disminución en los valores de pH, condición esta que favorece la absorción del nitrógeno en forma de nitrato, resultando en una liberación de iones OH^- al medio de cultivo y en consecuencia un aumento gradual en los niveles de pH.

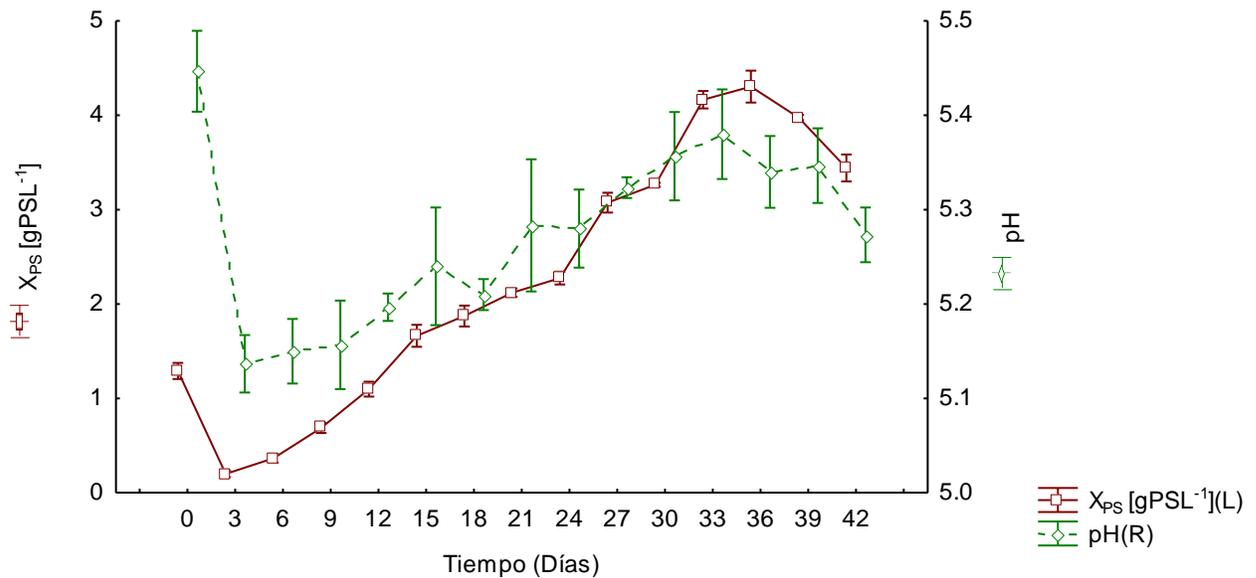


Gráfico 6. Curvas obtenidas de los valores de peso seco y pH a lo largo de la cinética de crecimiento, Las barras representan la media \pm SD.

En el gráfico 6 se muestran las curvas de crecimiento de peso seco y variación de pH contra el tiempo, en cuanto al crecimiento observado, cuando se presentó el valor de oscilación de pH más alto, también se registró la concentración de peso seco máxima, la cual disminuyó cuando el pH comenzó a bajar a partir del día 33, decreciendo de manera continua hasta el día 42.

7.5.2 Evaluación de la conductividad.

Peraza-Luna y col, 2001, han reportado el uso de mediciones de conductividad en el medio de cultivo para el cálculo indirecto de la X_{PS} , por lo cual se realizaron mediciones de la conductividad durante toda la cinética de crecimiento.

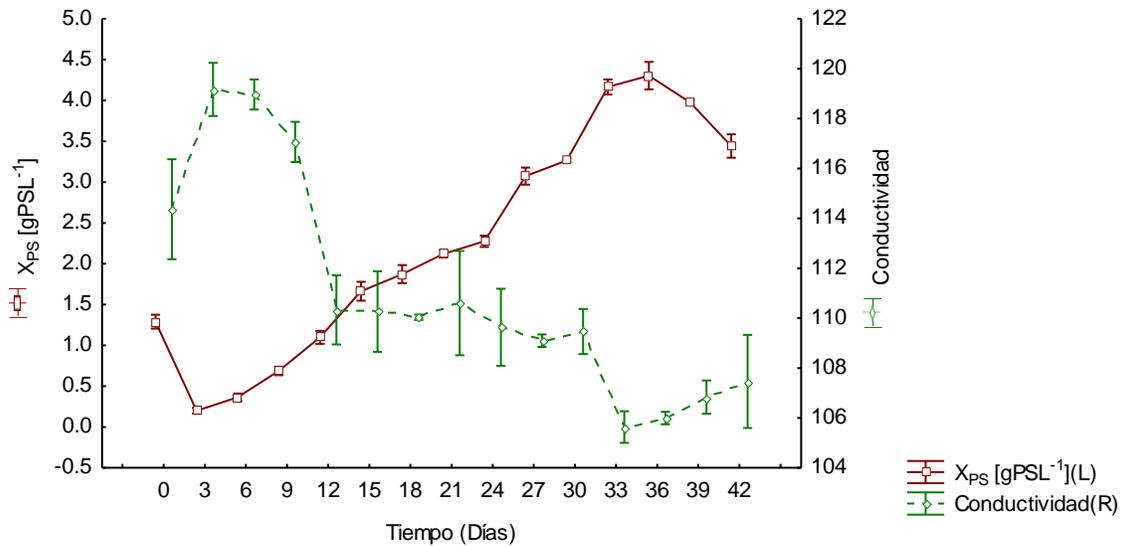


Gráfico 7. Curvas obtenidas de los valores de peso seco y conductividad a lo largo de la cinética de crecimiento. Las barras representan la media \pm SD.

En la gráfica 7 se muestran las curvas de biomasa seca y conductividad contra el tiempo, se puede observar que a medida que el pH y los valores de biomasa X_{PS} aumentan, los valores de conductividad disminuyen siguiendo una tendencia inversa, lo cual resulta del consumo de electrolitos del medio de cultivo que hace que el potencial eléctrico disminuya con la conductividad.

Los resultados obtenidos durante la cinética muestran que conductividad aumento notablemente durante los primeros 12 días, esto se debe principalmente a que a medida que aumenta la población celular en el medio de cultivo hay un mayor movimiento de iones (nutrientes) en el medio, lo cual causa que los valores de conductividad se eleven dándonos un valor máximo de 120.83 miliamperes (ma).

7.6 Consumo de carbohidratos

7.6.1 Curvas de calibración

Otro parámetro importante a evaluar en el cultivo de células en suspensión es el consumo de carbohidratos, lo cual se realiza analizando el medio de cultivo de las suspensiones en cada uno de los puntos de la cinética. Para llevarlo a cabo realizaron curvas de calibración de los azúcares que se midieron mediante una columna de tipo amino, los cuales son sacarosa, glucosa y fructosa (Grafico 8). Como se puede observar todas las gráficas de relación & concentración y área bajo la curva presentan un valor de R^2 (fructosa: 0.9992; glucosa: 0.9996; glucosa: 0.9995) muy cercano a 1, lo cual nos indica que son confiables para determinar el consumo de carbohidratos en la cinética.

Una vez obtenidas las curvas de calibración de los azúcares se procedió realizar la cuantificación del consumo de carbohidratos en el medio.

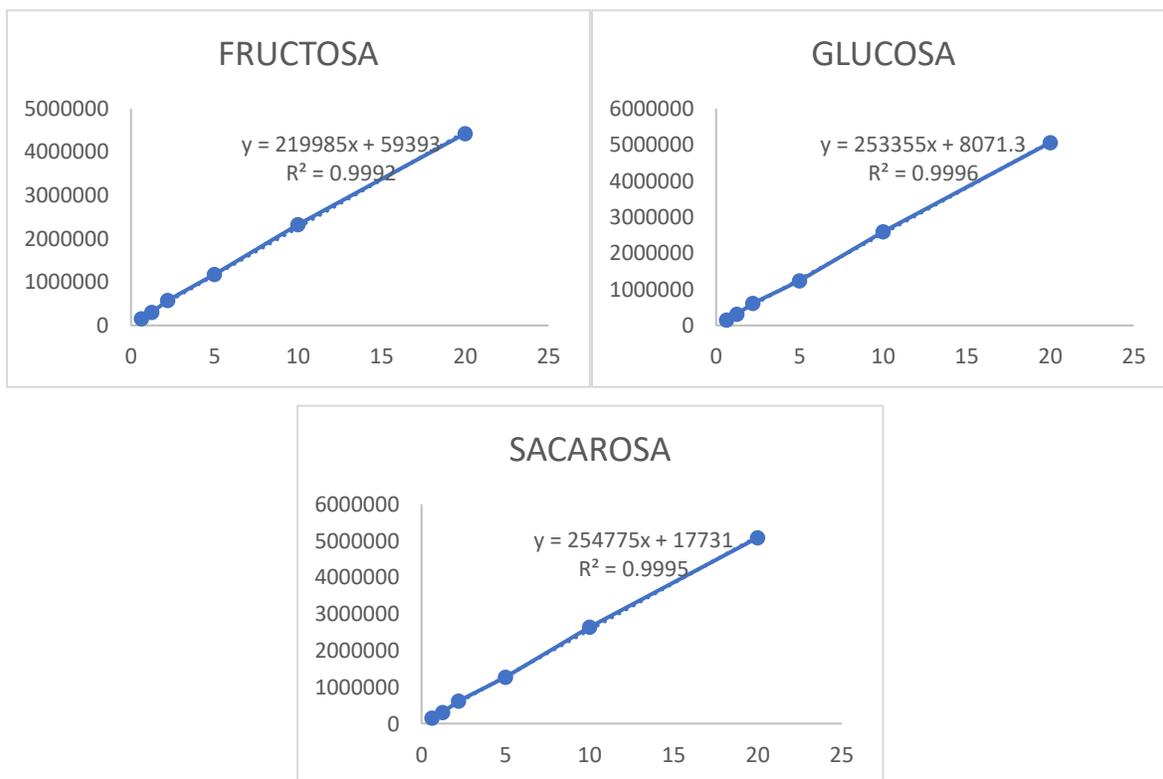


Gráfico 8. Curvas de calibración de Los azuceres.

7.6.2 Consumo de carbohidratos

La cinética de consumo de azúcares muestra hidrólisis de la sacarosa durante los primeros 6 días, esto se debe a que la pared celular de las células vegetales presenta enzimas denominadas invertasas capaces de hidrolizar la sacarosa en fructosa y glucosa, además de un consumo constante y preferencial de la glucosa respecto a la fructosa (Caspeta L., 2004).

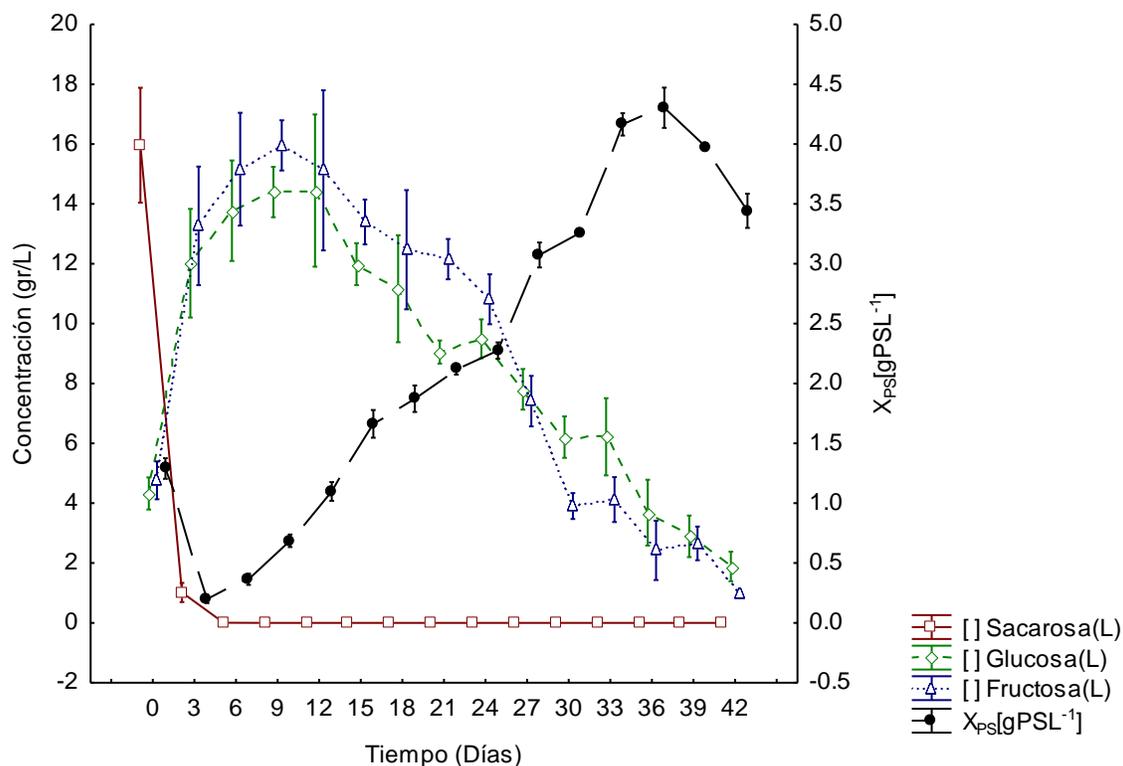


Gráfico 9. Curva de consumo de azúcares, fructosa, glucosa y sacarosa.

Inicialmente al medio de cultivo se le agregan 30 g/L de sacarosa comercial como fuente de carbono, por lo que se esperaría que al día cero la concentración de este azúcar oscilara en los 30 g/L, sin embargo, su concentración fue de 15.97 g/L, esto es debido a que la sacarosa tiene una naturaleza lábil al calor y se puede descomponer en gran medida en D-glucosa y D-fructosa después de autoclaveado (Wang J *et al.*, 2017). Esto se puede corroborar ya que al día 0 hay 4.33 g/L de glucosa y 4.76 g/L de fructosa, sin embargo, la suma total de los 3 azúcares (25.06 g/L) no alcanza los 30 g/L de sustrato, esto puede deberse a que cuando se realiza

la resiembra de las células estas presentan medio de cultivo pudiendo influir en el total de sustrato en el medio de cultivo (Castillo C., 2006).

La sacarosa se consume completamente al día 6 (0 g/L), lo que se correlaciona con una fase lag, el inicio rápido de la fase exponencial y los niveles más altos de glucosa (13.27 g/L) y fructosa (12.02 g/L) durante la cinética. Como podemos observar en el gráfico 9 el consumo de glucosa y fructosa es similar y correlaciona con lo observado en cultivos de células de *Solanum tuberosum* (Granger-Serrano *et al.*, 2017) y *A. officinalis* (Su y Arias, 2003), en donde se presentó una velocidad de hidrólisis de sacarosa mayor, pero el comportamiento similar respecto al consumo de glucosa y fructosa.

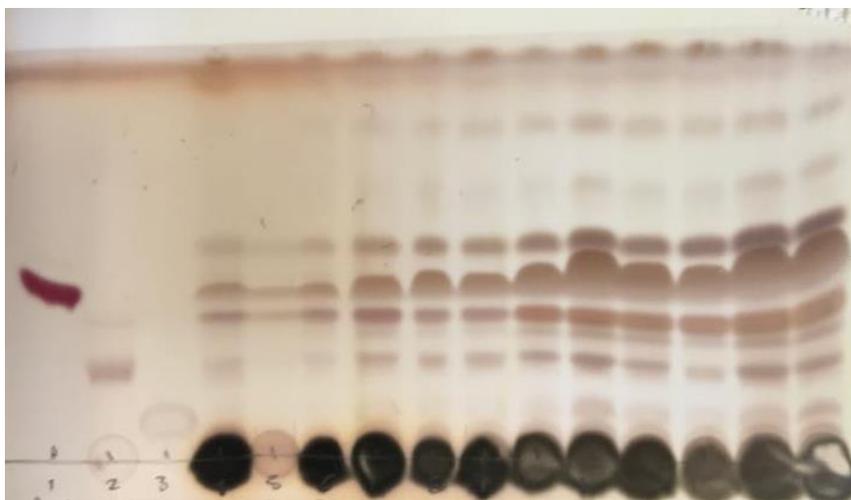
7.7 Cromatografía en capa fina

Se prepararon extractos partiendo del material vegetal seco, y se calculó el rendimiento a lo largo de la cinética de crecimiento a partir del peso seco total de cada punto y de la cantidad de extracto seco (Tabla 6).

Tabla 6. Rendimiento de los extractos de cada punto a lo largo de la cinética de crecimiento.

Tiempo	Biomasa Peso seco (gr)	Peso extracto
0	0.0645	0.093
1	0.00996667	0.047
2	0.01823333	0.089
3	0.03433333	0.128
4	0.05493333	0.125
5	0.08316667	0.133
6	0.09363333	0.132
7	0.106	0.157
8	0.11373333	0.154
9	0.1537	0.155
10	0.1632	0.156
11	0.20826667	0.157
12	0.223625	0.203
13	0.1955	0.206
14	0.17213333	0.204

Posteriormente los extractos fueron analizados mediante cromatografía de capa fina en un sistema de elución diclorometano:metanol 95:5 y revelados con Sulfato sérico. Como se puede observar en la figura 14, el extracto 1 y 2 fueron evaluados y presentaron un perfil cromatográfico similar, como referencia (RF) utilizamos un compuesto aislado de raíces transgénicas de *L. racemosa* LR3 (línea 2.3, 3.1, 6.4, 7.31 y 17.6) (Moreno-Anzures et al., 2017), también utilizamos como referencia ácido ursólico y β -sitosterol.



1. Ac. Ursólico
2. Fracción 225
3. LR3
4. Tiempo 0
5. Tiempo 1
6. Tiempo 2
7. Tiempo 3
8. Tiempo 4
9. Tiempo 5
10. Tiempo 6
11. Tiempo 7
12. Tiempo 8
13. Tiempo 9
14. Tiempo 10
15. Tiempo 11
16. Tiempo 12

Figura 14. Cromatoplaqa de los extractos obtenidos a partir de células en suspensión derivados de raíces transgénicas de *L. racemosa* Cav durante la cinética de crecimiento. Sistema de elución 95:5 Diclorometano: Metanol y revelado con Sulfato sérico

7.8 Obtención de extractos

Se cosechó biomasa a partir de callos derivados de raíces pilosas de la línea LRT 3.1 de *L. racemosa* durante un periodo de 12 meses de la cual se obtuvo un total de 5.57 kg en peso fresco, la cual se dejó secar para llevar a cabo las extracciones. A partir de esta biomasa seca se obtuvieron los extractos CH₂Cl₂:CH₃OH con los rendimientos presentados en la siguiente tabla 7.

Tabla 7. Rendimiento de extractos de cultivo de callos derivados de la línea LRT 3.1

LINEAS	RENDIMIENTO DE EXTRACTO		
	BIOMASA (g)	EXTRACTO (g)	RENDIMIENTO
LRT 3.1	57 g	18.8 g	31.33%
3.1	57 g	19.05 g	33.42%

Los extractos obtenidos a partir de los callos de la línea LRT 3.1, mostraron un mayor rendimiento, en comparación con los reportados para la planta silvestre y plántulas germinadas *in vitro* las cuales mostraron un rendimiento de 0.98% y 1.14% (Salinas *et al.*, 2014), en el caso del cultivo de raíces transformadas de *L. racemosa* se obtuvo un rendimiento de 16.04% y 14.28% en la línea LRT 17.6 y LRT 2.3 respectivamente (Moreno-Anzures., 2017).



Figura 15. Cromatoplaque de los extractos obtenidos a partir de callos derivados de raíces transgénicas de *L. racemosa* Cav. 1 y 2 (Callos LRT 3.1), R (LR3), AU (ácido ursólico), β (β-sitosterol). Sistema de elución 70:30 Hexano: Isopropanol y revelado con 4-hidroxibenzaldehído.

Posteriormente los extractos fueron analizados mediante cromatografía de capa fina en un sistema de elución 70:30 Hexano: Isopropanol y revelado con 4-hidroxibenzaldehído. Como se puede observar en la figura 19, el extracto 1 y 2 fueron evaluados y presentaron un perfil cromatográfico similar, como referencia (RF) utilizamos un compuesto aislado de raíces transgénicas de *L. racemosa* LR3 (línea 2.3, 3.1, 6.4, 7.31 y 17.6) (Moreno-Anzures et al., 2017), también utilizamos como referencia ácido ursólico y β -sitosterol.

Los perfiles cromatográficos de los extractos muestran en la cromatoplaca la presencia de β -sitosterol y ácido ursólico, los cuales presentan una variedad de actividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatoria, citotóxica y antibacteriana, entre otras (Kashyap, Tuli, and Sharma, 2016). Es importante mencionar que en CCF fue posible visualizar el compuesto LR3 en extractos de callos y que sería conveniente purificar este compuesto para poder cuantificar la producción del mismo a lo largo de la cinética.

7.9 Actividad farmacológica

7.9.1 Actividad antiinflamatoria

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad antiinflamatoria mediante el modelo *in vivo* de edema de oreja de ratón inducido por TPA de los extractos de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ provenientes de callos y células en suspensión derivados de la línea LRT 3.1 de *L. racemosa*. Los resultados obtenidos muestran (Grafica. 10) que los extractos derivados de callos presentaron un mayor porcentaje de inhibición de la inflamación con un 95.49%, seguido de las células en suspensión de la línea LRT 3.1 con un 87.45% este último resultado muy similar a el control positivo Indometacina con un porcentaje de inhibición de la inflamación 83.79%

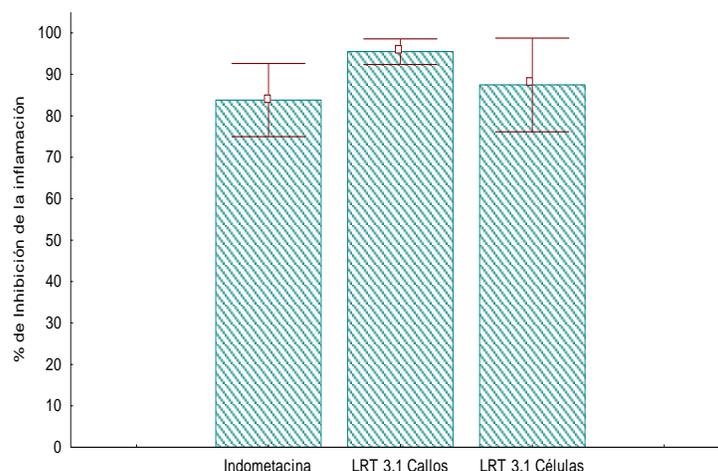


Gráfico 10. Porcentaje de inhibición de la inflamación. Los resultados presentan el promedio \pm desviación estándar. ANOVA post hoc Tukey con $n=4$.

Salinas *et al.*, 2014 reportan que los extractos diclorometanólicos derivados de la planta silvestre presentan un porcentaje de inhibición de la inflamación de 58.7% evaluados en el modelo *in vivo* de oreja de ratón inducido por TPA, a partir del cual se aislaron e identificaron dos compuestos que presentan dicha actividad, otro estudio realizado en cultivo de raíces pilosas transformadas de *L. racemosa* a partir del extracto de diclorometano:metanol se ha reportado que los extractos obtenidos de la línea LRT 3.1 presentan un porcentaje de inhibición de la inflamación de

92.14% estos resultados son similares a los obtenidos a partir de los extractos del presente trabajo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se llevó a cabo un ensayo dosis-respuesta de células en suspensión de la línea LRT 3.1, debido a que los extractos presentaron un alto porcentaje de inhibición de la inflamación, obteniendo una CI_{50} de 0.43 mg/oreja.

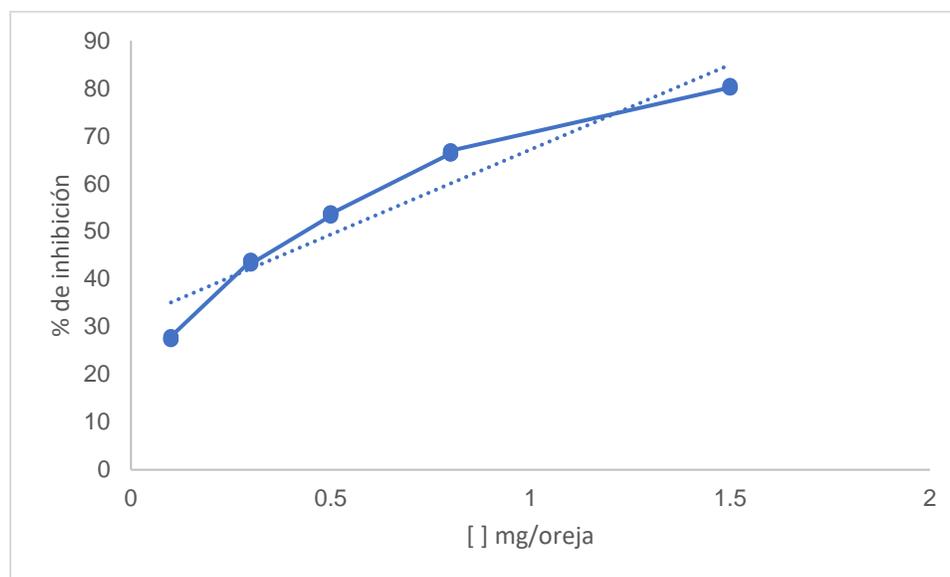


Gráfico 11. Curva de dosis respuesta del extracto diclorometano:metanol de la línea LRT 3.1 de suspensiones celulares.

Un estudio anterior en la línea de células en suspensión de la línea LRT 3.1, el extracto de diclorometano:metanol mostró una CI_{50} de 0.3 mg/oreja, para el caso del extracto de diclorometano de plantas silvestres de *L. racemosa* mostró un CI_{50} de 0.93 mg/oreja, estos resultados comparados con el extracto de los cultivos de células en suspensión in vitro de la línea LRT 3.1 es .23 veces menor para las células y 2.5 mayor para los extractos de la planta silvestre, los resultados muestran que los extractos de las suspensiones celulares es más potente que los del extracto de diclorometano de la planta silvestre.

7.9,2 Actividad citotóxica

La actividad citotóxica fue evaluada en las líneas celulares de cáncer de pulmón (A549) y de cérvix (CasKi), considerando como extracto activo aquellos que presentan una $Cl_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ de acuerdo al American National Cancer Institute. Con base a lo anterior, se observó que los extractos de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ callos y células en suspensión no presentan actividad contra la línea de carcinoma de pulmón (A549), sin embargo, si fueron activas contra la línea celular CasKi. El estándar utilizado fue podofilotoxina ($Cl_{50} = 0.94 \mu\text{g/ml}$ en A549 y $Cl_{50} = 0.49 \mu\text{g/ml}$ en CasKi).

Tabla 7. Actividad citotóxica de extractos de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ de cultivos de callos y células en suspensión de la línea LRT 3.1 de *L. racemosa*

Cultivos transformados	A549 ($\mu\text{g/ml}$)	CasKi ($\mu\text{g/ml}$)
Callos	>50	5.88 ± 0.0147
Células	>50	5.49 ± 0.020
Podofilotoxina	0.94772 ± 0.022	0.4937 ± 0.038

A549 (Carcinoma de pulmón) y CasKi (Carcinoma de Cérvix). Considerando $\leq 20 \mu\text{g/ml}$ como extracto activo y $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ para compuestos puros (de acuerdo al National Cancer Institute Guidelines).

Para la especie *L. racemosa* se ha reportado muy poco sobre la evaluación de la actividad citotóxica, sin embargo, existen estudios en la medicina tradicional mexicana sobre su uso para el tratamiento de cáncer de estómago (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007). Cruz-Paredes *et al* (2013), reportó la actividad citotóxica en esta especie en una línea celular de macrófagos derivados de humanos (THP-1), mostrando efectos citotóxicos por encima del 50%.

En otro estudio, Salinas *et al.*, (2014), reportó que el extracto diclorometano de la planta silvestre de *L. racemosa* no tiene actividad citotóxica en línea celular CasKi ($Cl_{50} = >30 \mu\text{g/ml}$), sin embargo, para el caso del extracto diclorometánico de obtenido de plántulas germinadas *in vitro* si hubo actividad contra la línea celular

CasKi. En 2017, Moreno-Anzures evaluó los extractos de CH₂Cl₂:CH₃OH de la línea LRT 3.1 mostrando actividad citotóxica contra tres líneas de cáncer humano (HeLa Cl₅₀ 19.95 µg/ml, HCT-15 Cl₅₀ 0.3 µg/ml y OVCAR 1.59 µg/ml). Comparados los resultados de este trabajo con los obtenidos por Salinas *et al.*, 2014, se observa que los extractos CH₂Cl₂:CH₃OH obtenidos de la línea LRT 3.1 de callos y células en suspensión mostraron ser más activas que las obtenidas en la planta silvestre.

CAPITULO 8. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se mejoró la producción de biomasa de los cultivos de callos derivados de la línea de raíces transformadas LRT 3.1 que mostraron un mayor índice de crecimiento adicionando 0.1 mg/L BAP y 1.0 mg/L de 2,4-D, con lo cual se consiguió la obtención de suspensiones celulares más homogéneas y disgregables.
- Se mejoró aún más el cultivo de células en suspensión derivado de la línea de raíces transformadas LRT 3.1, mediante la adición de MES 15 mM y 12.5 mg/L de ácido ascórbico, logrando detener la oxidación de las mismas y un aumento en su tasa crecimiento.
- Desde el punto de vista biotecnológico y de importancia farmacológica se obtuvieron extractos con altos rendimientos, además de que presentaron una alta actividad antiinflamatoria en el modelo in vivo de oreja de ratón inducida por TPA y citotóxica contra la línea de cáncer de cérvix (CasKi).
- Es importante mencionar que, mediante el análisis de cromatografía en capa fina, se lograron detectar compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica como lo es el ácido ursólico, β - sitosterol y LR3.

CAPITULO 9. PERSPECTIVAS

- Realizar la cuantificación de LR3 en los extractos obtenidos de callos y células en suspensión derivados de la línea LRT 3.1 de *L. racemosa* Cav, mediante la técnica de HPLC-IR.
- Realizar el fraccionamiento de los extractos para la purificación de compuestos de interés.
- Elicitar los cultivos de células en suspensión
- Evaluar los extractos contra otros tipos de células cancerosas y una línea de células sanas.
- Evaluar los extractos en otras actividades biológicas
- Conocer el contenido metabólico de los extractos activos.

CAPITULO 10. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar C, Juárez R, Bugarín M, Juárez L, Cruz C, 2012. Hierbas aromáticas y muestras medicinales en México: tradición e innovación, *Revista Bio Ciencias* 2 (3) p. 119-129

Aguilar-Piedras J, Xique-Vásquez M, García S & Baca BE. 2008. Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Rev Latinoam Microbiol.* 50: 29-37.

Biblioteca virtual de medicina tradicional UNAM. 2009.
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>.

Bruneton, J. B. (1991). *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. Acribia.

Bonilla-Barbosa J.R. y Villaseñor-R. J.L. 2003. Catálogo de la Flora del Estado de Morelos. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca.

Bourgaud, F, Gravot A, Milesi S, Gontier E 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* (161) p. 839-851

Calva Calva, G., & Pérez Vargas, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Trayectos*.

Caspeta L. (2004). Producción de Saponinas antifúngicas en biorreactores tipo airlift, a partir de cultivos de raíces transformadas de *Solanum chrysotrichum*. Tesis de Maestría CEIB-UAEM.

Chattopadhyay S. Farkya S. Sirvastava K. Bisaria S. 2002. Bioprocess Considerations for Production of Secondary Metabolites by Plant Cell Suspension Cultures, Delhi, Hauz Khas, New Delhi 110016, India. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7 (3) p. 138-149.

CONABIO (1998). Diversidad Biológica de México: estudio de país. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Citado por García-Jiménez, A. L. (2009) "Introducción a las plantas medicinales en México" Conferencia dictada en ocasión de la Jornada sobre Plantas

medicinales, 8 de octubre 2009, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Casa Libertad, Iztapalapa, México D.F.

Cruz Paredes C. Bolivar Balbás P. Gemez Velasco A. Nelly Juarez Z. Sanches Arreola E. Hernández L. Bach O. (2013). Antimicrobial, Antiparasitic, Anti-inflammatory, and Citotoxic Activities of *Lopezia racemosa*. *Hindawi* (1) p.6.

Curtis, W. R., & Emery, A. H. (1993). Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnology and bioengineering*, 42(4), 520-526.

Díaz-Granados, C, & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49-61.

Ferl, R., Paul A. L. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.

Fishel, F. M. (2006). Gibberellins. Agronomy department, Florida cooperative extension service, Institute of food and agricultural sciences, University of Florida, USA.

Gamborg, O. L. (2002). Plant tissue culture. biotechnology. milestones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(2), 84-92.

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(4), 272-289.

George (1993). Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4)

Granger-Serrano, L. F. *Evaluación del potencial del cultivo de células en suspensión de papa (Solanum tuberosum subsp. andígena) como plataforma de producción de proteínas recombinantes* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede (Medellín)).

- Hooykaas, P. J., & Schilperoort, R. A. (1992).** Agrobacterium and plant genetic engineering. In *10 Years Plant Molecular Biology* (pp. 15-38). Springer Netherlands.
- Huang, T. K., & McDonald, K. A. (2009).** Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*, *45*(3), 168-184.
- Kashyap, D., Tuli, H. S., & Sharma, A. K. (2016).** Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life sciences*, *146*, 201-213.
- Keng, C. L., See, K. S., Hoon, L. P., & Lim, B. P. (2008).** Effect of plant growth regulators and subculture frequency on callus culture and the establishment of *Melastoma malabathricum* cell suspension cultures for the production of pigments. *Biotechnology*, *7*(4), 678-85.
- Marqués, N. T., Nolasco, G. B., & Leitão, J. P. (2011).** Factors affecting in vitro adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian. *Scientia horticultrae*, *129*(2), 176-182.
- Mathur, S., & Shekhawat, G. S. (2013).** Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: an in vitro approach for production of stevioside. *Acta Physiologiae Plantarum*, *35*(3), 931-939.
- McDonald, K. A., Jackman, A. P., & Hurst, S. (2001).** Characterization of plant suspension cultures using the focused beam reflectance technique. *Biotechnology letters*, *23*(4), 317-324
- Monroy-Ortíz, C., Monroy, R., & Chichinautzin, C. B. (2006).** M6 Las plantas, compañeras de siempre: La experiencia en Morelos.
- Monroy-Ortiz C. y Castillo-España P. (2007).** Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos CONABIO, CIB Y CEIB, UAEM, p. 321-339
- Moreno-Anzúrez, N. (2012).** Establecimiento de cultivos de células en suspensión y raíces pilosas, a partir de *Lopezia racemosa* Cav., para la producción de compuestos con actividad antiinflamatoria. Tesis de maestría UAEM.

- Moreno-Anzúrez, N. E., Marquina, S., Alvarez, L., Zamilpa, A., Castillo-España, P., Perea-Arango, I., ... & Arellano-García, J. (2016).** A Cytotoxic and Anti-inflammatory Campesterol Derivative from Genetically Transformed Hairy Roots of *Lopezia racemosa* Cav. (Onagraceae). *Molecules*, 22(1), 118.
- Mundo, J., Villeda-Hernández, J., Herrera-Ruiz, M., del Carmen Gutiérrez, M., Arellano-García, J., León-Rivera, I., & Perea-Arango, I. (2017).** Neuropharmacological and neuroprotective activities of some metabolites produced by cell suspension culture of *Waltheria americana* Linn. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 129-139.
- Mulabagal, V., & Tsay, H. S. (2004).** Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int J Appl Sci Eng*, 2(1), 29-48.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Navarro, C. (2011).** Micropropagación de *Lopezia racemosa* Cav para la obtención de compuestos con actividad antiinflamatoria tesis de maestría UAEM.
- Ochoa, J. C., Chavarriaga, P., & López, C. (2012).** Embriogénesis somática y producción de callo embriogénico friable de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 20.
- OMS. (1979).** The selection of essential drugs. Second Report of the WHO Expert Committee. *The selection of essential drugs. Second Report of the WHO Expert Committee.*
- Park, S. Y.; Murthy, H. N.; Paek, K. Y. 2000.** Mass multiplication of protocormlike bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 63 (1): 67-72.
- Pierik, R. L. 1990.** Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: MundiPrensa, p. 301.

- Pedroza, J., & Corchuelo, G. (1997).** Analisis de crecimiento de *Limonium sinuatum* Mill cv. Midnight Blue propagada sexual y asexualmente a partir de yemas vegetativas y florales. *Agronomía Colombiana*, 14(1), 1-12
- Peraza-Luna, F., Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Bessiere, J. M., & Calva-Calva, G. (2001).** Sotolone production by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* in airlift with mesh bioreactors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(12), 6012-6019
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011).** Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4).
- Raj, D., Kokotkiewicz, A., Drys, A., & Luczkiewicz, M. (2015).** Effect of plant growth regulators on the accumulation of indolizidine alkaloids in *Securinega suffruticosa* callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123(1), 39-45.
- Sakakibara, H. (2006).** Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 431-449.
- Salinas M. R. (2008).** Identificación, cuantificación y comparación de la producción de LR1(6-Opalmitoil-3-O- β -D-glucósido de β -sitosterol) en cultivos in vitro y plantas silvestres de *Lopezia racemosa* Cav. (Hierba del golpe). Tesis de Maestría. CEIB-UAEM.
- Salinas, Roberta, Jesús Arellano-García, Irene Perea-Arango, Laura Álvarez, María Luisa Garduño-Ramírez, Silvia Marquina, Alejandro Zamilpa, Patricia Castillo-España, (2014).** Production of the AntiInflammatory Compound 6-O-Palmitoyl-3-O- β -D-glucopyranosylcampesterol by Callus Cultures of *Lopezia racemosa* Cav. (Onagraceae), molecules p. 1-12
- Sánchez R. M. (2010).** Aislamiento y caracterización química de los constituyentes con actividad antiinflamatoria presentes en los extractos de *n*-hexano y metanol de *L. racemosa* Cav. Tesis de licenciatura. CIQ-UAEM,ITA.
- Sharma, M. K., Solanke, A. U., Jani, D., Singh, Y., & Sharma, A. K. (2009).** A simple and efficient Agrobacterium-mediated procedure for transformation of tomato. *Journal of biosciences*, 34(3), 423.

- Singh, B., & Sharma, R. A. (2015).** Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*, 5(2), 129-151.
- Stetler, D. A., & Laetsch, W. M. (1965).** Kinetin-induced chloroplast maturation in cultures of tobacco tissue. *Science*, 149(3690), 1387-1388.
- Street, H. E. (1977).** *Cell (suspension) cultures-techniques* (pp. 59-99). Oxford: Blackwell.
- Su, W. W., & Arias, R. (2003).** Continuous plant cell perfusion culture: bioreactor characterization and secreted enzyme production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 95(1), 13-20.
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011).** Auxin–cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant*, 4(4), 616-625.
- Szabados, L., Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991).** Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*, 173-210.
- Taiz L, Zeiger E (2002).** Fisiología Vegetal (volumen 2) Synauer Associates Inc Barcelona, España ISBN 978-84-8021-601-2. 1338.
- Taiz L, Zeiger E (2006).** Fisiología Vegetal (volumen 2) Synauer Associates Inc Barcelona, España ISBN 978-84-8021-601-2. 1338.
- Tinland, B., Schoumacher, F., Gloeckler, V., Bravo-Angel, A. M., & Hohn, B. (1995).** The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *The EMBO journal*, 14(14), 3585-3595.
- Trejo-Tapia, G., Cerda-García-Rojas, C. M., Rodríguez-Monroy, M., & Ramos-Valdivia, A. C. (2005).** Monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* (Willd) DC cell suspension cultures in a stirred tank bioreactor. *Biotechnology progress*, 21(3), 786-792.

Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 17(2), 147-154.

Valderrama, A. M. (2005). Transformación de plantas mediada por Agrobacterium:" INGENIERÍA GENÉTICA NATURAL APLICADA". *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58(1).

Vanneste S, Friml J (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136:1005- 1016. 2. Ljung K (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140:943-950.

Wagner, K. H. Elmadfa, I. (2003). Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and triterpenes. *Ann Nutr Metab* 47:96-106.

Widholm, J. M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain technology*, 47(4), 189-194.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 02 / 05 / 19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (Tutor principal)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez
Dr. Alfonso Leija Salas
Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Tesis: "Producción de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica
a partir de células transformadas en suspensión de *Lopezia racemosa Cav.*

Alumno que la presenta a revisión: JOSE LUIS LOPEZ ANGELES

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 02/05/19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (Tutor principal)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez
Dr. Alfonso Leija Salas
Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Tesis: "Producción de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica a partir de células transformadas en suspensión de *Lopezia racemosa* Cav.

Alumno que la presenta a revisión: JOSE LUIS LOPEZ ANGELES

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 02/05-19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (Tutor principal)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez
Dr. Alfonso Leija Salas
Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Tesis: "Producción de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica
a partir de células transformadas en suspensión de *Lopezia racemosa Cav.*

Alumno que la presenta a revisión: JOSE LUIS LOPEZ ANGELES

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 02/05/19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (Tutor principal)
Dra. Maria del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez
Dr. Alfonso Leija Salas
Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Tesis: "Producción de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica a partir de células transformadas en suspensión de *Lopezia racemosa Cav.*

Alumno que la presenta a revisión: JOSE LUIS LOPEZ ANGELES

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALFONSO LEIJA SALAS



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 02/05/19

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (Tutor principal)
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez
Dr. Alfonso Leija Salas
Dr. Ramón Suárez Rodríguez

Tesis: "Producción de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica a partir de células transformadas en suspensión de *Lopezia racemosa* Cav.

Alumno que la presenta a revisión: JOSE LUIS LOPEZ ANGELES

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ