



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Posgrado en Biotecnología

**“Determinación de la actividad antiinflamatoria de extractos de cultivos *in-vitro* de**

***Cnidoscolus chayamansa*”**

**T E S I S**

Para obtener el grado de  
Doctora en Biotecnología  
P R E S E N T A

**M. en C. Mariana Zuleima Pérez González**

**Matricula: 2161800944**

**marizuley@hotmail.com**

**ORCID: 0000-0003-4662-2449**

**Director:**

Dr. Francisco Cruz Sosa  
Departamento de Biotecnología, UAM Iztapalapa.

**Co-Director:**

Dra. María Adelina Jiménez Arellanes  
Unidad de Investigación Médica en Farmacología, CMN SXXI, IMSS.

**Sínodo:**

**Presidente:**

Dr. Fernando Rivera Cabrera

**Secretaria:**

Dra. Angelica Román Guerrero

**Vocal:**

Dra. Mariana Sánchez Ramos

Dr. Gabriel Alfonso Gutiérrez Rebolledo

Iztapalapa, Ciudad de México a 12 de marzo 2020

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

México D.F. a 12 de marzo del 2020

Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico:  
es también un niño colocado ante fenómenos naturales  
que le impresionan como un cuento de hadas  
-Marie Curie-

Doctorado en biotecnología

Pérez González Mariana Zuleima

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

Determinación de la actividad antiinflamatoria de extractos de cultivos *in-vitro* de  
*Cnidaxcolus chayamansa*

que presentó

Mariana Zuleima Pérez González

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Co Director: Dra. María Adelina Jiménez Arrellanes

Asesor: Dra. María Elena Estrada Zúñiga

Jurado:

Presidente: Dr. Fernando Rivera Cabrera



Secretario: Dra. Angelica Román Guerrero



Vocal: Dr. Gabriel Alfonso Gutiérrez Rebolledo



Vocal: Dra. Mariana Sánchez Ramos





Fecha : 11/03/2020  
Página : 1/1

**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACIÓN PÚBLICA de DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA de la alumna MARIANA ZULEIMA PEREZ GONZALEZ, matrícula 2161800944, quien cumplió con los 286 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 45 créditos de PUBLICACION, 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha doce de marzo del 2020 presentó la DEFENSA de su DISERTACIÓN PÚBLICA cuya denominación es:

Determinación de la actividad antiinflamatoria de extractos de cultivos in-vitro de *Cnidocolus chayamansa*.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 466 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarte la calificación de:

Aprobar

**JURADO**

Presidente

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

Secretaría

DRA. ANGÉLICA ROMAN GUERRERO

Vocal

DR. GABRIEL ALFONSO GUTIERREZ  
REBOLLEDO

Vocal

DRA. MARIANA SANCHEZ RAMOS

## Agradecimientos

- A la Dra. Adelina Jiménez Arellanes por la dirección de este proyecto, por todo el apoyo, paciencia y comprensión otorgada
- Al Dr. Francisco Cruz Sosa por la dirección y el apoyo otorgado durante la realización de la de tesis, paciencia y comprensión.
- A la Dra. Angelica Román Guerrero por el apoyo para la realización de la identificación de metabolito secundarios por HPLC
- A mis compañeros de la UIMF: Margarita, Jesús, Iván, Tzayaca y Ariel por los momentos de alegría y apoyo durante este proceso.
- A mis compañeros del laboratorio R-003 de la UAM-I: Abraham y Aurelio por todos las enseñanzas, vivencias y apoyo durante la realización de este proceso.
- A los miembros del comité total:
  - Dr. Gabriel Alfonso Gutiérrez Rebolledo
  - Dra. Mariana Sánchez Ramos
  - Dr. Fernando Rivera Cabrera
  - Dra. Angelica Román Guerrero

Por todas las observaciones, sugerencias y comentarios al presente trabajo que permitieron enriquecerlo, así como por su valioso tiempo invertido en la revisión del escrito.

## Dedicatoria

A mis padres Olivia González Conde y Juan Mariano Pérez Mendoza por apoyarme siempre en todas mis decisiones, por ser un gran ejemplo de lucha y perseverancia, por enseñarme a no claudicar en momentos difíciles y por contar siempre con su apoyo, por la educación que me brindaron forjando día a día la persona que soy con mucho cariño para ustedes.

**¡¡Los amo!!**

A mis hermanos Yael y Luis Mario por no juzgarme y ser otro de mis motores para sonreír y vivir todos los días, por ser grandes hermanos y aliados.

**¡¡Los amo!!**

A Reynel por ser mi soporte emocional, las enseñanzas y la paciencia, a pesar de limitar el tiempo de convivencia siempre me apoyo y me brindo su mano, gracias por todo.

A mi hija C. Fernanda por ser mi principal motor de perseverancia, por entender que todo el esfuerzo es por ella y para ella, por todas las enseñanzas de vida que hemos compartido, este logro es para mostrarte que puedes ser valiente, perseverante y firme para enfrentar las adversidades de la vida.

**¡Todo el esfuerzo es para ti mi niña te amo!**

**A Dios gracias** por cada detalle y momento durante la realización de la presente tesis, gracias a él por ser la base de tu moral, por cada día en el que te permitió despertar no solo con vida, sino que también me permitió continuar con salud, fuerzas y empeño; para que con cada avance durante mi vida, cada experiencia y momento en la vida, fuera solo un momento de aprendizaje, un momento mediante el cual creciste como persona, y un momento, el cual fue necesario para que en este momento, estés en la culminación de tu proyecto.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo con el número de beca 295519 y numero de CVU 543187 para la realización del Doctorado en Biotecnología en la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, con número de matrícula 2161800944.





Al instituto Mexicano de Seguridad Social por el apoyo otorgado como becario de investigación con la matrícula 2015067 para la realización de estudios de Doctorado en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Hospital de Especialidades de Centro Médico Siglo XXI.

## Resumen

En la actualidad y desde tiempos remotos, el uso de plantas medicinales ha constituido un recurso de gran importancia para aliviar diversos problemas de salud y en algunos casos coadyuvan en los tratamientos alopáticos, por lo que constituye una alternativa ampliamente utilizada por la población. Además, el elevado costo de los fármacos convencionales, los severos efectos secundarios y/o adversos que estos provocan, aunado a la resistencia que han desarrollado los microorganismos, hacen de las plantas medicinales una fuente accesible y económica de remedios para los sectores poblacionales más vulnerables y de bajo nivel económico. En este contexto, *Cnidocolus chayamansa* conocida como "chaya", es empleada principalmente como alimento en el sureste de México por su alto valor nutricional; además, posee diversos usos etnomedicinales: para tratar diabetes, reumatismo, trastornos gastrointestinales, problemas renales y antihipertensivo. Las hojas de *C. chayamansa* contienen proteínas, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos, flavonas y glucósidos cianogénicos. Por otro lado, las principales actividades biológicas reportadas son: antioxidante, hipoglucemiante, antiinflamatoria, hepatoprotectora, cardioprotectora, e hipocolesterolemiante. Por lo anterior se propuso utilizar una herramienta biotecnología para la optimización de compuestos con actividad biológica, principalmente la antiinflamatoria.

En el capítulo I se describe la adaptación de *C. chayamansa* y la obtención de explantes asépticos. Se realizó la obtención de callos con ayuda de distintos reguladores del crecimiento vegetal (RCV), mezclando una auxina con una citoquinina, como resultado a lo anterior, se obtuvieron callos con mejor morfología utilizando la mezcla de ANA (5 mg/L) + BAP (2.5 mg/L).

Posteriormente en el capítulo II se utilizó la combinación de ANA (5 mg/L) + BAP (2.5 mg/L) para la obtención del cultivo de células en suspensión; realizando una cinética de crecimiento celular de la cual se obtuvieron los siguientes parámetros: 1) velocidad de crecimiento ( $\mu = 0.078d^{-1}$ ); 2) tiempo de duplicación celular ( $td = 8.8 d$ ); 3) biomasa máxima ( $b_{max} = 8.98 \pm 0.02 g/L$ ); 4) índice de crecimiento ( $IC = 6.23 \pm 0.056 g/L$ ). Se identificó que en el día 40 pos-cultivo se concentraba la mayor cantidad de metabolitos secundarios, posteriormente se realizó el extracto  $CHCl_3:MeOH$  y se denominó ANB. Por cromatografía en capa fina (ccf) se detectó escopoletina (SCO),  $\beta$ -sitosterol, acetato de lupeol (AL), acetato de moretenol y otros triterpenos en el extracto ANB y por HPLC se identificó

ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinámico, quercetina y se cuantificó  $\alpha$ -amirina (82.83 mg/g ANB de peso seco), acetato de  $\beta$ -amirina (82.31 mg/g ANB de peso seco), SCO (38.88 mg/g ANB de peso seco) y AL (38.1 mg/g ANB de peso seco).

En el capítulo III se describe la actividad antioxidante, antibacterial y antiinflamatoria del extracto ANB, dando como resultados un valor de  $CI_{50}=16.60$  mg/mL para el potencial antioxidante *in-vitro*. Por otro lado, se evaluó la actividad antibacteriana y el extracto ANB fue moderadamente activo contra tres cepas: *S. aureus* (ATCC 23,235) *S. coagulasa* (ATCC 93,410) y *C. albicans* (ATCC 10,231). El extracto ANB mostró una actividad antiinflamatoria mayor a la ya reportada previamente para el extracto de la planta silvestre en el modelo de inflamación aguda sistémica (carragenina) mostrando una  $DE_{50} = 223.87$  mg/kg, mientras que para el modelo de inflamación aguda tópica la  $DE_{50}$  fue de 0.48 mg/oreja. En cuanto a la actividad antiinflamatoria crónica se evaluó en el modelo crónico de TPA. Se utilizó como fármaco de referencia indometacina a la dosis de 8 mg/kg y el extracto ANB a la dosis efectiva media calculada previamente para el modelo agudo de carragenina en donde el extracto se administró vía intragástrica (225 mg/kg), observando una disminución en el peso corporal en todos los tratamientos, así como una disminución en el tamaño de las orejas en el grupo control TPA + ANB. Por último, se midió la actividad de la enzima mieloperoxidasa, la cual fue inhibida en un 34.55% en el grupo tratado con el extracto ANB, similar al mostrado por el fármaco de referencia (40.02%).

## Abstract

Nowadays and since ancient times, the use of medicinal plants has been a resource of great importance to treat various health problems and in some cases, they contribute to allopathic treatments, so it is an alternative widely used by the population. In addition, the high cost of conventional drugs, the severe side and/or adverse effects they cause, coupled with the resistance that microorganisms have developed, make medicinal plants an accessible and economical source of remedies for the most vulnerable and low-economic population sectors. In this context, *Cnidocolus chayamansa* known as "chaya", is mainly used as food in southeastern México for its high nutritional value; In addition, it has various ethnomedicinal uses, to treat diabetes, rheumatism, gastrointestinal disorders, kidney problems and antihypertensives. The leaves of *C. chayamansa* contain proteins, vitamins, minerals, amino acids, fatty acids, flavones and cyanogenic glycosides. On the other hand, its main biological activities reported are antioxidant, hypoglycemic, anti-inflammatory, hepatoprotective, cardioprotective, and hypocholesterolemic. Therefore, it was proposed to use a biotechnology tool for the optimization of compounds with biological activity, mainly the anti-inflammatory.

Chapter I describes the adaptation of *C. chayamansa* and obtaining aseptic explants. Calluses were obtained with the help of different plant growth regulators (PGRs), mixing an auxin with a cytokinin, as a result of the above, corns with better morphology were obtained using the mixture of ANA (5 mg/L) + BAP (2.5 mg/L).

Later in Chapter II the combination of ANA (5 mg/L) + BAP (2.5 mg/L) was used to obtain the culture of cells in suspension; performing a cell growth kinetics from which the following parameters were obtained: 1) growth rate ( $\mu = 0.078d^{-1}$ ); 2) cell doubling time ( $td = 8.8 d$ ); 3) maximum biomass ( $b_{max} = 8.98 \pm 0.02 g/L$ ); 4) growth rate ( $GI = 6.23 \pm 0.056 g/L$ ). It was identified that on day 40 post culture the greatest amount of secondary metabolites was concentrated, subsequently the  $CHCl_3$ : MeOH extract was made and called ANB. SCO,  $\beta$ -sitosterol, AL, moretenol acetate and other triterpenes in the ANB extract were detected by TLC and by HPLC, caffeic acid, ferulic acid, cinnamic acid, quercetin and quantify  $\alpha$ -amirin (82.83 mg/g ANB DW) were identified,  $\beta$ -amirin acetate (82.31 mg/g ANB DW), scopoletin (SCO) (38.88 mg/g ANB DW) and lupeol acetate (LA) (38.1 mg/g ANB DW).

Finally, in the chapter III describes the antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activity of the ANB extract, resulting in an  $IC_{50}$  value of 16.60 mg/mL for the antioxidant potential in vitro. On the other hand, the antibacterial activity was evaluated and the ANB extract was moderately active against three *S. aureus* (ATCC 23,235) *S. coagulase* (ATCC 93, 410) and *C. albicans* (ATCC 10,231) strains. The ANB extract showed a greater anti-inflammatory activity than the one already reported previously for the wild plant extract in the systemic acute inflammation model (carrageenan) showing an  $ED_{50} = 223.87$  mg/kg, while for the topical acute inflammation model (TPA) the  $ED_{50}$  was 0.48 mg/ear. Regarding the chronic anti-inflammatory activity evaluation, it was performed with the chronic model of TPA. A reference drug (indomethacin) was used at the dose of 8 mg/kg and the ANB extract at the average effective dose previously calculated in the acute carrageenan model where the extract was administered intragastrical (225 mg/kg), observing a decrease in body weight in all treatments, as well as a decrease in the size of the ears in the TPA+ ANB control group. Finally, the activity of the myeloperoxidase enzyme was also measured, which was inhibited in 34.55% in the group treated with the ANB extract, similar to that shown by the reference drug (40.02%).

# 1. Índice

<b>1. ÍNDICE</b> .....	<b>14</b>
1.1. Índice de figuras .....	16
1.2. Índice de tablas.....	17
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>21</b>
1. Antecedentes.....	<b>22</b>
1.1. Importancia de plantas medicinales a nivel mundial.....	22
1.2. Metabolitos secundarios (MtS).....	24
1.3. La biotecnología como herramienta para la producción del material vegetal .....	25
1.4. Generalidades de <i>Cnidocolus chayamansa</i> (chaya).....	27
1.5. Clasificación botánica de <i>Cnidocolus chayamansa</i> .....	27
1.6. Antecedentes sobre la investigación química de <i>C. chayamansa</i> .....	28
2. Objetivos particulares .....	<b>29</b>
3. Metodología .....	<b>29</b>
3.1. Colecta y determinación taxonómica del material vegetal .....	29
3.2. Material vegetal y establecimiento del cultivo aséptico .....	29
3.3. Calogénesis .....	31
4. Resultados.....	<b>32</b>
4.1. Colecta e identificación taxonómica del material vegetal. ....	32
4.2. Preparación del cultivo aséptico.....	32
4.3. Inducción de callo.....	33
5. Conclusiones .....	<b>35</b>
6. Productividad .....	<b>36</b>
7. Referencias. ....	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>40</b>
1. Antecedentes.....	<b>41</b>
1.1. Cultivo de células vegetales (CCV) .....	41
1.2. Ventajas y aplicaciones de los CCV. ....	42
1.3. Biotecnología de productos farmacéuticos de plantas naturales .....	42
2. Objetivos particulares .....	<b>42</b>
3. Metodología .....	<b>43</b>
3.1. Establecimiento de cultivo de células en suspensión .....	43

3.2.	Optimización de las condiciones de cultivos en suspensión.....	44
3.3.	Cinéticas de crecimiento.....	44
3.4.	Identificación de metabolitos mayoritarios.....	45
3.5.	Cuantificación e identificación de metabolitos secundarios por HPLC.....	45
3.6.	Identificación de compuestos fenólicos.....	45
3.7.	Cuantificación de escopoletina (SCO).....	46
3.8.	Cuantificación de acetato de lupeol (AL).....	46
3.9.	Obtención del extracto a partir de cultivos de células en suspensión (CNIII).....	47
4.	Resultados y discusión.....	47
4.1.	Establecimiento del cultivo de células en suspensión.....	47
4.2.	Optimización del cultivo de células en suspensión.....	48
4.3.	Cinética de crecimiento celular.....	49
4.4.	Identificación de metabolitos mayoritarios.....	50
4.5.	Identificación de compuesto fenólicos por HPLC.....	52
4.6.	Cuantificación de acetato $\alpha$ y $\beta$ amirina.....	53
4.7.	Cuantificación de escopoletina (SCO).....	55
4.8.	Cuantificación de acetato de lupeol (AL).....	56
5.	Conclusiones.....	59
6.	Productividad.....	60
7.	Referencias.....	61
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>64</b>
1.	Antecedentes.....	65
1.1.	Inflamación.....	65
1.2.	Procesos inflamatorios y su relación con diversas enfermedades.....	65
1.3.	Inflamación crónica.....	67
1.4.	Terapias antiinflamatorias.....	67
1.5.	Efectos adversos.....	69
1.6.	Compuestos obtenidos por proceso biotecnológico con actividad antiinflamatoria.....	69
2.	Objetivos particulares.....	72
3.	Metodología.....	72
3.1.	Potencial antioxidante, iinhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	72
3.2.	Actividad antibacteriana.....	73
3.3.	Actividad antiinflamatoria.....	73
3.3.2.	Inducción del proceso inflamatorio aguda con carragenina.....	74
3.3.3.	Evaluación de la actividad antiinflamatoria crónica: Ensayo de Mieloperoxidasa (MPO) ..	75
4.	Resultados y discusión.....	75
4.1.	Potencial antioxidante.....	75
4.2.	Actividad antibacteriana.....	77
4.3.	Actividad antiinflamatoria.....	78
4.3.1.	Actividad antiinflamatoria aguda sistémica inducida con carragenina.....	78
4.3.2.	Actividad antiinflamatoria aguda tópica inducida con TPA.....	81
4.3.3.	Actividad antiinflamatoria crónica.....	84

5. Conclusiones ..... 88

CONCLUSIONES GENERALES ..... 89

6. Referencias. .... 90

ANEXOS ..... 93

Anexo 1: Curva de calibración de glucosa para el método Fenol-Sulfúrico ..... 93

Anexo 2: Curva de calibración para la cuantificación de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina..... 94

Anexo 3: Curva de calibración para la cuantificación de SCO. .... 95

Anexo 4: Curva de calibración para la cuantificación de AL. .... 96

**1.1. Índice de figuras**

Figura 1 Defensa de plantas para la producción de MtS (tomado de Sepúlveda-Jiménez et al., 2003) \_\_\_\_ 24

Figura 2.- 1.-Distribución geográfica de *Cnidioscolus spp* (Imagen tomada de <https://www.naturalista.mx/taxa>). 2.-Detalle de hojas, flores y frutos de *C. chayamansa*, (a) Arbusto, (b) inflorescencia, (c) detalle de hojas, (d) detalle de inflorescencia de flores y fruto. (Tomado de Pérez-González et al., 2016) \_\_\_\_\_ 28

Figura 3 Diagrama del establecimiento de explantes asepticos y cultivos de callos \_\_\_\_\_

Figura 4 Porcentaje de asepsia según los tratamientos utilizados. Cada grupo está representado como la media ( $\pm$ ). n=20 \_\_\_\_\_ 33

Figura 5 Diagrama de establecimientos de cultivos de células en suspensión e identificación de metabolitos \_

Figura 6 Biomasa obtenida con distintas combinaciones de RCV. Cada grupo está representado como la media ( $\pm$ ) y su error estándar (e.e.). n=5 \_\_\_\_\_ 48

Figura 7 a) Cultivo de células en suspensión de *C. chayamansa* empleando un inóculo del 6% de callos derivados de explantes de hoja con ANA (2.5 mg/L) y BAP (5 mg/L); b) Células \_\_\_\_\_ 49

Figura 8 Caracterización del crecimiento del cultivo en suspensión celular de *C. chayamansa* durante los 60 días de incubación. \_\_\_\_\_ 50

Figura 9 Perfil cromatográfico por ccf de los extractos de la cinética de crecimiento celular para la identificación de compuestos de naturaleza terpénica. \_\_\_\_\_ 51

Figura 10 Cromatografía en capa fina para la identificación de cumarinas. \_\_\_\_\_ 52

Figura 11 Cromatograma de HPLC para la identificación de fenoles en el extracto de ANB empleando algunos estándares comerciales de fenoles (Sigma) \_\_\_\_\_ 53

Figura 12 Estructura química de la quercetina. \_\_\_\_\_ 53

Figura 13 Cromatograma de HPLC para la identificación de AA en el extracto de ANB en comparación con el estándar comercial (Sigma). \_\_\_\_\_ 54

Figura 14 Estructura química de acetato de  $\alpha$ -amirina (A) y acetato de  $\beta$ -amirina (B). \_\_\_\_\_ 55

Figura 15 Cromatograma de HPLC para la identificación de SCO en el extracto de ANB en comparación con el estándar comercial (Sigma). \_\_\_\_\_ 55

Figura 16 Estructura química de SCO \_\_\_\_\_ 56

Figura 17 Cuantificación de Alen el extracto ANB obtenido durante el periodo de incubación (60 días). \_\_ 57

Figura 18 Cromatograma de HPLC para la identificación de SCO en el extracto de ANB en comparación con el estándar comercial (Sigma) a) Estándar AL ( $t_R=21.952$ ) b) Extracto ANB ( $t_R=22.002$ ) \_\_\_\_\_ 58

Figura 19 Actividad antiinflamatoria aguda inducida con carragenina. \_\_\_\_\_ 81

Figura 20 Actividad antiinflamatoria aguda tópica inducida con TPA. \_\_\_\_\_ 83

Figura 21 Ganancia de pesos corporal de ratones expuestos al modelo de inflamación crónica por TPA. \_\_ 84

Figura 22 Actividad antiinflamatoria del extracto ANB en el modelo de inflamación crónico TPA. \_\_\_\_\_ 85



*Figura 23 Efecto macroscópico de los tratamientos a los 10 días en las orejas de ratos hembras Balb/C.* \_\_ 86  
*Figura 24 Inhibición de la actividad de la mieloperoxidasa con el extracto ANB obtenido de células en suspensión de C. chayamansa.* \_\_\_\_\_ 87

## 1.2. Índice de tablas

*Tabla 1 Respuesta a la formación de callo de distintas combinación de RCV* \_\_\_\_\_ 34  
*Tabla 2 Características de callos formados con las combinaciones elegidas para cultivo de células en suspensión.* \_\_\_\_\_ 47  
*Tabla 3 Porcentaje de inhibición del radical DPPH con respecto a la concentración de* \_\_\_\_\_ 76  
*Tabla 4 Valores de la actividad antimicrobiana (método de Bauer y Kirby) del extracto ANB* \_\_\_\_\_ 77  
*Tabla 5 Actividad antiinflamatoria del extracto ANB sobre el edema subplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/C machos.* \_\_\_\_\_ 79  
*Tabla 6 Actividad antiinflamatoria del extracto ANB sobre el edema auricular tópico inducido con TPA* \_\_ 82

## Abreviaturas

<b>ABTS</b> 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid	<b>COX</b> Ciclooxygenasa
<b>AINEs</b> Antiinflamatorios no esteroideos	<b>ANB</b> Extracto de las células en suspensión de <i>C. chayamansa</i> (CHCl <sub>3</sub> :MeOH)
<b>HPLC</b> High Performance Liquid Chromatography	<b>OMS</b> Organización Mundial de Salud
<b>AO</b> Antioxidante	<b>DPPH</b> 2,2-diphenylpicrylhydrazyl
<b>AST</b> Aspartato aminotransferasa	<b>GA3</b> Ácido giberélico
<b>CCF</b> Cromatografía en Capa Fina	<b>SJ</b> Solución jabonosa
<b>M</b> Macrófago	<b>PG</b> Prostaglandina
<b>CI<sub>50</sub></b> Concentración inhibitoria media	<b>EPOC</b> Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>DE<sub>50</sub></b> Dosis efectiva media	<b>RL</b> Radicales libres.
<b>MeOH</b> Metanol	<b>SOD</b> Superóxido dismutasa
<b>GI</b> Gastrointestinal	<b>FA</b> Fosfatasa alcalina
<b>TPA</b> 12-O-tetradecanoilfoból-13-acetato	<b>STZ</b> Estreptozitocina
	<b>TNF</b> Factor de Necrosis Tumoral alfa

## Introducción

Las plantas medicinales utilizadas por la industria farmacéutica como fuente de materia prima para el desarrollo y obtención de fármacos y fitofármacos tienen distintas limitantes; en ocasiones su crecimiento sólo es en ciertas épocas del año y se localizan en zonas geográficas específicas además que por la sobreexplotación algunas especies se encuentran ya en peligro de extinción, como en el caso de las plantas endémicas; otros factores que limitan la disponibilidad de este recurso es el tiempo de crecimiento y la alta y creciente urbanización, el bajo rendimiento de los extractos obtenidos de ellas, así como las bajas concentraciones de sus metabolitos secundarios bio-activos. Algunas especies vegetales son altamente valoradas y sobreexplotadas en medio silvestre debido a su fácil acceso y poca inversión económica para su uso como remedios herbolarios por una población de bajos recursos sometida cambios de estilo de y los trastornos de salud relacionados con el estilo de vida, siendo una gran problemática a nivel social en cualquier país en vías de desarrollo (Pathania *et al.*, 2015; Shahidul *et al.*, 2019).

El uso de plantas medicinales continúa expandiéndose rápidamente por todo el mundo, ahora la población recurre a estos productos para el tratamiento de diversos problemas de salud, debido al suministro insuficiente de medicamentos alópatas, el costo inaccesible de los tratamientos y los efectos secundarios adversos derivados de éstos; sin dejar de mencionar que actualmente existe una incipiente resistencia de los microorganismos a los fármacos convencionales, debido al fenómeno social de la auto-medicación (Shahidul *et al.*, 2019).

En esta última década se ha tenido un aumento de la tecnología para el desarrollo de nuevos fármacos. Las farmacéuticas están desarrollando diferentes preparados a base de plantas medicinales, los cuales ya están en comercialización. Alrededor del 80% de la población pertenece a los países en vías de desarrollo y estos dependen de la atención médica primaria y sus patologías son tratadas con los sistemas básicos de medicamentos, esto los lleva a cubrir sus necesidades con otro tipo de terapias llevando a la práctica la medicina tradicional, haciendo uso de productos medicinales a base de hierbas, por ejemplo, en el sector de la oncología, las plantas han contribuido con más del 60% de los medicamentos contra el cáncer, directa o indirectamente. Los productos naturales proporcionan alrededor del 50% de los fármacos modernos, sin dejar a un lado, que en algunas poblaciones las plantas

medicinales son parte integral de su medicina tradicional teniendo gran importancia dentro de su cultura (Sharadwat *et al.*, 2013; Anand *et al.*, 2019).

Se sabe que existen entre 350,000 - 550,000 especies de plantas medicinales a nivel mundial de las cuales solo el 20% cuenta con investigación documentada sobre su potencial medicinal para distintos padecimientos (Sen and Samanta, 2014). Dentro de la literatura científica se reportan distintas plantas medicinales con potencial antiinflamatorio en distintos modelos agudos, algunos ejemplos son: *Cnidioscolus chaymansa* (Pérez-González *et al.*, 2017), *Malva parviflora*, *Lantana trifolia*, *Rungiapectinata* (Murugesan y Deviponnuswamy, 2014) *Sphaeralcea angustifolia* (Pérez-Hernández *et al.* 2014) *Acacia farnesiana*, *Astianthus viminalis*, *Justicia spicigera*, *Piper auritum*, *Brickellia paniculata*, *Helianthemum glomeratum*, *Rubus coriifolius*, *Chamaedora tepejilote*, *Lantana hispida*, *Larrea tridentata* *Teloxys graveolens*, *Oenothera rosea*, *Eucalyptus globulus* y *Sphaeralcea angustifolia* (Meckes *et al.*, 2004).

También se reportan dicha actividad biológica en modelos crónicos de inflamación como el de Adyuvante completo de Freund, en el cual *Moussonia deppeana* (Gutiérrez-Rebolledo *et al.*, 2017), *Albizia lebbek*, *Chloranthus eretus*, *Rubia cardifolia*, *Sclerocarya birrea*, *Semecarpus anacardium*, (Murugesan y Deviponnuswamy, 2014) y *S. angustifolia* (García-Rodríguez *et al.*, 2012) mostraron resultados favorables. *S. angustifolia* fue candidata a pruebas en fase clínica en un estudio doble-ciego; el experimento se llevó a cabo en 130 pacientes diagnosticados con osteoartritis, del total de pacientes 55 fueron tratados con un gel que contenía extracto estandarizado de *S. angustifolia* al 1% (enriquecido con hidroxycumarinas) mientras que 58 pacientes fueron tratados con diclofenaco al 2 %. La efectividad terapéutica del gel administrado vía tópica por 4 semanas fue de 89% mientras que la del grupo control (diclofenaco al 2%) fue de 91.3%, lo que destaca del estudio es que los pacientes que recibieron el tratamiento del gel no mostraron efectos adversos, pero si una mejoría de su padecimiento (Romero-Cerecero *et al.*, 2013).

Debido a esto, la industria farmacéutica se ha encargado de la búsqueda de nuevas estrategias para erradicar las diferentes problemáticas en cuanto al uso de plantas medicinales con principios activos optando por las herramientas biotecnológicas, específicamente el cultivo de células vegetales (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

Los bajos rendimientos de metabolitos secundarios presentes en las plantas silvestres han llevado a la búsqueda de alternativas para aumentar el rendimiento de estos, una de estas alternativas es la aplicación de la biotecnología (disciplina orientada al desarrollo e innovación de tecnologías que involucran el manejo del material biológico para la producción de un bien o servicio) (SMBB, 2018). Uno de los contrastes de la aplicación de procesos biotecnológicos para la producción de metabolitos secundarios presentes en plantas, es la cantidad de compuesto obtenido, ya que el rendimiento es mayor y aumenta la disponibilidad del mismo en un menor periodo de tiempo, usando además muy poca biomasa inicial para mantener el cultivo celular (Yue *et al.*, 2014).



En este capítulo se describe los procedimientos para obtención de explantes asépticos, la formación de callos con distintas combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y el monitoreo de la morfología del callo.

# *Capítulo I*

Plantas medicinales: Obtención de explantes y callos.

## 1. Antecedentes

### 1.1. Importancia de plantas medicinales a nivel mundial.

El uso de las plantas medicinales se remonta a los inicios de la civilización humana, estas se empezaron a utilizar por la necesidad que tenían los seres humanos para resolver sus problemas de salud y desde esa época hasta nuestros días muchas enfermedades han sido tratadas con plantas medicinales. Las grandes culturas antiguas como China, India, Mesoamerica y Nor-africana proporcionaron evidencia escrita sobre el uso de las plantas para tratar una gran variedad de enfermedades. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), una planta medicinal está definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Zhang *et al.*, 2009; Gutiérrez-Rebolledo *et al.*, 2017).

Actualmente no se tiene un dato exacto sobre el uso de las plantas; sin embargo, la OMS estima que entre el 65 y 80% de la población mundial hace uso de este recurso, recientemente se está incrementando este uso en países desarrollados, por ejemplo, en China el 40 % de la población las utiliza, en Australia el 48%, en Canadá, Japón y Chile el 70%, mientras que en Estados Unidos se incrementó en un 42%. En general los medicamentos a base de plantas medicinales (conocidos como fitomedicamentos), son considerados seguros y contienen varios componentes biológicamente activos, los cuales presentan escasos efectos secundarios; sin embargo, existen reportes clínicos sobre la interacción que se presenta al emplear plantas combinadas con medicamentos convencionales, hecho que es muy común (Calixto, 2005; Ekor, 2014; Gutiérrez-Rebolledo *et al.*, 2014). Muchos remedios naturales, ya sean extractos de plantas o compuestos puros aislados, ofrecen oportunidades ilimitadas para la creación de nuevos fármacos debido a la disponibilidad sin precedentes de su diversidad química (Frag *et al.*, 2015).

Hoy en día el interés científico sobre las plantas medicinales se ha incrementado debido a los elevados costos y efectos secundarios que provocan los medicamentos alópatas (Konaté *et al.* 2012). Sin embargo, el 25% de los principios activos de los medicamento alópatas fueron aislados y/o sintetizados de plantas (Beyene, Beyene, and Deribe 2016). En el mundo se consumen numerosos fitomedicamentos y estos son usados principalmente para el resfriado común (66%), la gripe (38%), digestivo y/o enfermedades intestinales (25%), cefalea (25%),

insomnio (25%), úlcera gástrica (34%), nerviosismo (21%), trastornos circulatorios (15%), bronquitis (15%), enfermedades de la piel (15%) la fatiga y el agotamiento (12%) (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Existen distintos fitomedicamentos ya comercializados y utilizados en la medicina moderna, algunos de estos son parte de los constituyentes activos como la Digoxina, cardiotónico aislado de *Digitalis purpurea* (nombre común púpura); Aescin antiinflamatorio y venotónico aislado de *Aesculus hippocastanum* (nombre común castaña de indias); otro compuesto comercializado es el Ajmalicine el cual contiene alcaloides del indol usado para trastornos circulatorios, y aislados de *Rauwolfia serpentina*. Por otro lado existen fitomedicamentos que fueron sintetizados de distintas plantas medicinales, algunos de estos son: paclitaxel (anticancerígeno) semi-sintetizado por Bristol-MyersSquibb desde 2002 a partir de 10-desacetilbacatina III aisladas de *Taxus baccata*; la diosgenina, sapogenina esteroidea obtenida de los tubérculos de varias especies de Dioscorea, esta puede ser sintetizada químicamente para obtener progesterona; el fosfato de oseltamivir (Tamiflu) este es utilizado para el tratamiento de la influenza (virus A y B) (Farak et al., 2015). La guanidina es un producto natural con buena actividad hipoglucémica aislada de *Galega officinalis* (L), sin embargo, la guanidina resulto ser tóxica para el consumo humano, gracias a esto se sintetizaron compuestos con menor toxicidad y con un efecto similar, como la metformina (dimetilbiguanidina) esta es utilizada para el tratamiento de la diabetes tipo II. Para satisfacer las demandas del mercado, que cada vez es mayor, las empresas se ven en la necesidad de descubrir nuevas fuentes de materia prima de plantas medicinales (PM) (Krentz and Bailey 2005).

Una gran variedad de compuestos orgánicos es sintetizada por plantas, estos compuestos se clasifican principalmente como metabolitos primarios (MtP) y secundarios (MtS). Los MtP son necesarios para los procesos básicos de la planta como la fotosíntesis, respiración, el crecimiento y el desarrollo. Los MtS se acumulan específicamente y no son intermediarios de procesos químicos de la planta. Estos compuestos son muy diversos y su distribución varía ya que se restringe a especies taxonómicamente relacionadas. Aunque las funciones de los MtS no están directamente relacionadas con la función básica de la planta estos metabolitos desempeñan varios papeles de interacción con la planta y su entorno, algunos de estos son: proporcionar protección contra patógenos, protección contra tensiones abióticas, (como la radiación UV), tienen la función de atraer insectos polinizadores, moléculas de señal y son

una gran fuente de principios activos para el aislamiento, síntesis o semi-síntesis de nuevos fármacos (Gandi *et al.*, 2015).

### 1.2. Metabolitos secundarios (MtS)

EL metabolismo es un conjunto de reacciones químicas y enzimáticas cuya finalidad es la transferencia de masa y energía que permite la vida de los organismos. En este proceso participan principalmente los metabolitos primarios que son los compuestos esenciales y universales en todas las especies (carbohidratos, lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos). Los MtS son particulares de cada especie y algunos no son esenciales, pero cumplen un papel importante en la interacción del organismo con su medio ambiente (Figura 1) (Ramakrishna and Ravishankar 2011; Sepúlveda-Jiménez 2003)

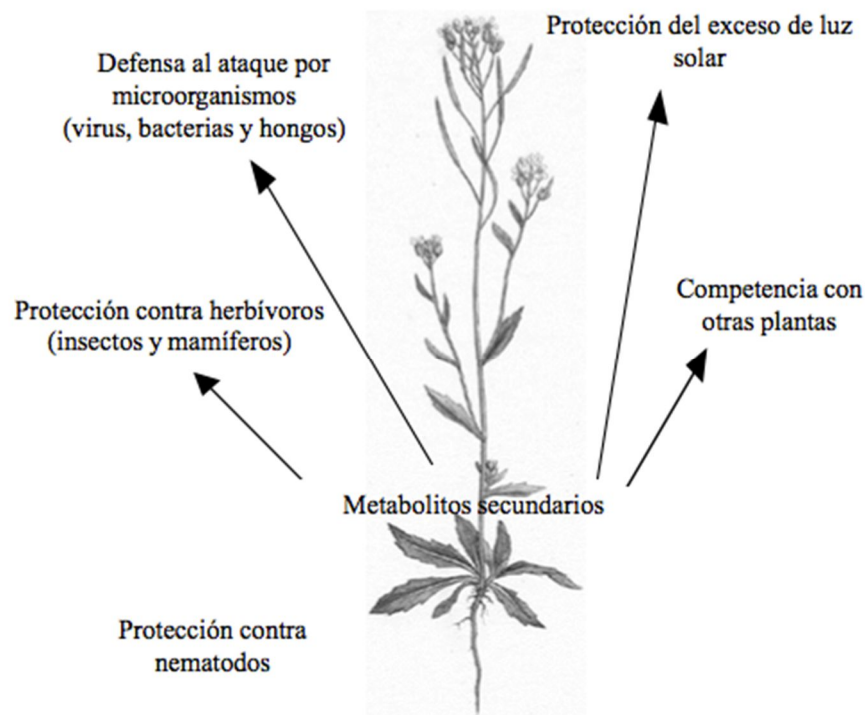


Figura 1 Defensa de plantas para la producción de MtS (tomado de Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003)

Las plantas no poseen un sistema inmunológico como tal; sin embargo, sí presentan un mecanismo de defensa biótico y abiótico con la finalidad de defenderse del daño ocasionado por heridas y ataques de insectos o microorganismos patógenos. Los principales mecanismos de defensa son: mejoramiento de la pared celular, esto conlleva a una barrera más rígida y menos digerible para insectos, este se complementa con el desarrollo de espinas, espigas, tricomas y pelos glandulares; otro mecanismo de defensa es la protección química o la



producción de MtS. Los MtS hoy en día son una fuente de principios activos, generando interés en las industrias como farmacéutica, alimentaria, agroquímicas, de colorantes y biopesticidas. De los 30000 MtS conocidos más del 80% son aislados de productos naturales, a nivel mundial 121 medicamentos recetados son derivados de plantas (Rao y Ravishankar, 2002)

Las plantas continúan ofreciendo productos novedosos, es así como surge la necesidad de aplicar procesos biotecnológicos para aumentar la mejora en su producción, aumentando los rendimientos y ofreciendo a la población alternativas con menores efectos adversos que los medicamentos sintetizados.

La biotecnología es el uso de organismos vivos para proporcionar productos o procesos útiles; sin embargo, hoy en día la biotecnología se refiere a una amplia gama de tecnologías de desarrollo que permiten la modificación de rasgos heredables fuera del organismo vivo y la reintroducción posterior de los nuevos rasgos en un organismo para los propósitos específicos. En el caso de la biotecnología vegetal se intenta obtener nuevos productos (MtS) para un fin en específico (Suslow *et al.*, 2002)

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

En los últimos años el uso de técnicas *in vitro* para la regeneración y/o propagación de plantas se han usado en gran medida, sin embargo, estos modelos no solo se realizan con este fin, también es utilizado para entender los aspectos básicos del desarrollo de la planta.

La propagación de la planta puede lograrse de manera indistinta, por cualquiera de los procesos que se describen a continuación:

- Embriogénesis, es la formación de estructuras bipolares (embriones) o a través de la organogénesis.
- Organogénesis o generación de órganos específicos, generación de callos, brotes o raíces.

En general el proceso de organogénesis está constituido por tres distintas etapas: inducción de callo, inducción de brote e inducción de raíz, estos dos últimos pasos se denominan regeneración. La regeneración puede ocurrir directamente o indirectamente, en función de sí

se requiere una proliferación intermedia de tejido indiferenciado (callo) (Elhiti y Stasolla 2012).

Dentro de la literatura científica no existen reportes sobre el cultivo *in vitro* de *C. chayamansa*; sin embargo, sí existen evidencias sobre el género Euphorbiaceae, del cual se describen distintas maneras de manipulación *in vitro* (germinación de semilla, nodos de cotiledones, tejidos de hipocotilo, regeneración de raíces, cultivos a partir de hojas, nodos e internodos, iniciación de callos, cultivos y co-cultivos en suspensión, embriogénesis somática, cultivo de embrión organogénesis, morfogénesis de cultivos a partir de endospermas, cultivos para generar flores y frutos), siendo el medio más utilizado el Murashige and Skoog (Murashige y Skoog, 1962) (MS). La especie más estudiada para cultivos de células vegetales son las del género *Phyllanthus* de donde se obtuvieron callos de *P. emblica*, *P. urinaria*, *P. amarus*, *P. abnormis*, *P. caroliniensis*, *P. tenellus* y *P. niruni*; de esta última especie se describen estudios donde obtienen raíces transformadas; otras especies estudiadas son: *Jatropha curcas* de la cual obtuvieron brotes de raíz a partir de brotes de hojas, y *Manihot esculenta* de la cual obtuvieron brotes a partir de nodos (Komdamudi *et al.*, 2009).

Estudios sobre cultivo de células vegetales para *P. caroliniensis* (Euphorbiaceae) describen el uso de explantes de nodo obteniendo una multiplicación máxima de 21 a 23 brotes por cada uno, en medio MS o Anderson Rhododendron (AR) suplementado con 5.0  $\mu\text{M}$  de 6-benziladenina (BA), 1.25-5.0  $\mu\text{M}$  de cinetina o 2.5-5.0  $\mu\text{M}$  de 6- $\gamma,\gamma$ -dimetilalilaminopurina (2iP). El enraizamiento lo lograron con un 80 a 100% de microbrotes con medio MS sin reguladores de crecimiento, aunque aumento significativamente el número de raíces con 1.25  $\mu\text{M}$  de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 1.25-5  $\mu\text{M}$  de ácido indolacético (AIA). También obtuvieron un 88% de climatización de las plantas en un periodo de 3 a 4 semanas. Identificaron metabolitos como estigmasterol, varios terpenos como el glochinodonol, glochidiol, glochidone (Catapan *et al.*, 2000). El terpeno glochidone aislado recientemente de *Ipomea pescaprae* (L.) tiene significativa actividad contra el dolor neurogénico e inflamación, efecto muy semejante al estigmasterol (Krogh *et al.*, 1999). Los autores mencionan que la planta es apta para cultivos de células y raíz, para la obtención de metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria (Catapan *et al.*, 2000).

Otro estudio con explantes de nodo de *P. urinaria* (Euphorbiaceae), en donde la multiplicación máxima es de 16-20 brotes en medio MS o AR suplementado con 5.0  $\mu\text{M}$  Kinetina. El enraizamiento fue significativo con un 93 a 100% de microbrotes en medio MS sin reguladores de crecimiento, aunque aumento significativamente el número de raíces con 1.25-5  $\mu\text{M}$  de ANA. Realizaron un perfil fitoquímico identificando solo estigmasterol (Catapan *et al.*, 2002).

#### **1.4. Generalidades de *Cnidoscolus chayamansa* (chaya).**

Esta especie pertenece a la familia Euphorbiaceae, es un arbusto que se distribuye principalmente en la región maya de Guatemala, Belice, el sureste de México y partes de Honduras (BDMTM, 2016) (Figura 2). El género *Cnidoscolus* está compuesto por 50 especies, de las cuales 20 son endémicas de México, las hojas son amplias y tiene más de 3 lóbulos; las flores son de tonalidades blancas, algunas veces cuentan con semillas (Steinmann, 2002; Cifuentes *et al.*, 2010). La planta es poco conocida fuera de la región; sin embargo, existen evidencias históricas que era una planta importante para los mayas de la península de Yucatán y Centro América.

#### **1.5. Clasificación botánica de *Cnidoscolus chayamansa***

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Subfamilia: Crotonoideae

Tribu: Manihoteae

Género: *Cnidoscolus*

Especie: *chayamansa*

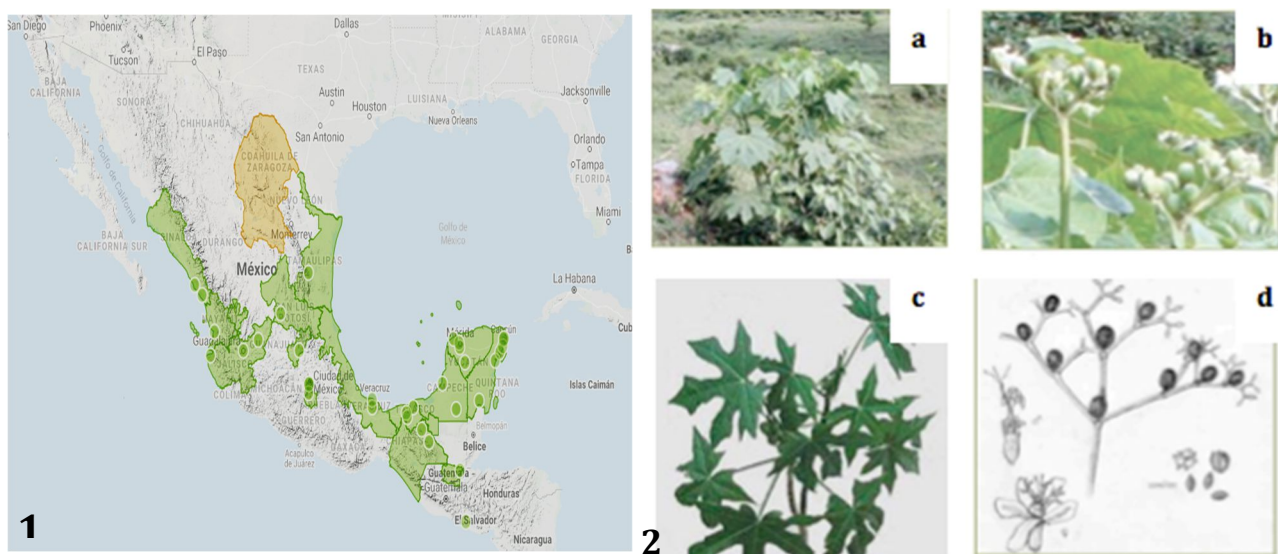


Figura 2.- 1.-Distribución geográfica de *Cnidoscolus* spp (Imagen tomada de <https://www.naturalista.mx/taxa>). 2.-Detalle de hojas, flores y frutos de *C. chayamansa*, (a) Arbusto, (b) inflorescencia, (c) detalle de hojas, (d) detalle de inflorescencia de flores y fruto. (Tomado de Pérez-González *et al.*, 2016)

### 1.6. Antecedentes sobre la investigación química de *C. chayamansa*

Las hojas y tallos de esta especie medicinal contienen tiamina, niacina, riboflavina, retinol,  $\beta$ -caroteno y ácido ascórbico; minerales (calcio, hierro, fósforo, potasio, magnesio, sodio, manganeso, zinc y cobre); proteínas conformadas por aminoácidos esenciales como triptófano, alanina, arginina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina y valina. El aceite esencial de las hojas contiene ácidos grasos como palmítico, esteárico, oleico, mirístico, araquidónico, láurico y linoléico. Además, se describen flavonas como quercetina, kampferol, amentoflavona, astragalina (kamperol-3-O-rutinósido), naringenina, rutina, catequina, ácido protocatéquico, dihidromirecetina, cumarina y glucósidos cianogénicos como la linamarina, taninos, saponinas y polímeros de lignina (Cáceres *et al.*, 2010; Kuti y Kuti, 1999; Jiménez-Arellanes *et al.*, 2014; Valenzuela-Soto *et al.*, 2015; Pérez-González *et al.*, 2016). Contiene además ácido protocatéquico (0.242 mg/g) y rutina (2 mg/g), estos compuestos fueron identificados por HPLC al comparar sus tiempos de retención con estándares comerciales (Loarca-Piña *et al.*, 2010). El contenido de ácido clorogénico en hojas crudas frescas fue de 1217.3 mEq/kg (miliequivalentes químicos por kilogramo) y en hojas cocidas fue de 733.5 mEq/kg. También se ha determinado el

contenido de quercetina (44.7  $\mu\text{g/g}$ ) y kampferol (22.4  $\mu\text{g/g}$ ) en hojas crudas y hojas cocidas (18.1  $\mu\text{g/g}$  de kampferol y 40.2  $\mu\text{g/g}$  de quercetina). Contiene dos glucósidos de kampferol identificados como 3-O-ranmosilglucósido, 3-O-ranmosilgalactósido-7-O-ranmósido y la quercetin-3-O-ranmósido en diferentes concentraciones en hojas crudas y cocidas (Kuti y Konuru 2004). Por último, en el extracto  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  contiene polifenoles identificados como, 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi flavanona y kampferol-3,7-dimetil éter (Pérez-Gonzalez *et al.*, 2017).

## 2. Objetivos particulares

- Determinar distintas condiciones abióticas para obtener explantes y callos asépticos.
- Evaluar diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal en mezclas para la obtención de callo a partir de explantes.

## 3. Metodología

### 3.1. Colecta y determinación taxonómica del material vegetal

Plantas vivas de aproximadamente un año de edad se colectaron en la Ciudad de México. Las plantas fueron fertilizadas y acondicionadas en el invernadero de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Un ejemplar se depositó en el Herbario del IMSS CMN SXXI, y se identificó taxonómicamente. Una vez transcurridos tres meses, la planta mejor adaptada (más saludable) fue seleccionada como fuente de explantes, a la cual se le removieron las hojas inmaduras de 3-5 cm de longitud.

### 3.2. Material vegetal y establecimiento del cultivo aséptico

Las hojas se sometieron a 4 diferentes tratamientos para lograr el cultivo aséptico, siguiendo la metodología descrita por Estrada-Zúñiga (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009) con modificaciones.

**Tratamiento 1 (T1).** - Los explantes fueron colocados en solución jabonosa (SJ) durante 10 min y enjuagados con agua corriente, posteriormente éstos se sumergieron durante 1 min en una solución EtOH al 70% (v/v) y se enjuagaron con agua destilada. Después, se sumergieron durante 10 min en una solución de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) al 0.6% + Tween-20 0.2% (v/v), con agitación moderada. Finalmente, se hicieron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril.

**Tratamiento 2 (T2).** - Los explantes fueron colocados en SJ durante 10 min y enjuagados con agua corriente, posteriormente se sumergieron durante 20 min en una solución con fungicidas (Shogun (500 FW Syngenta) 0.01 mL/L y fungoxyl (UPL Agro) 0.01g/L), consecutivamente se sumergieron durante 1 min en una solución EtOH al 70% (v/v) y enjuagados con agua destilada. Posteriormente, se sumergieron durante 10 min en una solución de NaClO al 0.6% + Tween-20 0.2% (v/v), con agitación moderada. Finalmente, enjuagaron 3 veces con agua bidestilada estéril.

**Tratamiento 3 (T3).** - Los explantes se colocaron en SJ por 10 min y enjuagados con agua corriente, posteriormente se sumergen en una solución de antibióticos (Ampicilina 150 mg/L, Tetraciclina 15 mg/L y Cefotaxima 15 mg/L) por 30 min; posteriormente, se sumergieron por 20 min en una solución con fungicidas (Shogun 0.001 mL/mL y fungoxyl 0.001g/mL) y fueron enjuagados con agua destilada, consecutivamente durante 1 min se colocaron en una solución EtOH al 70% (v/v) y son enjuagados con agua destilada. Se sumergieron durante 10 min en una solución de NaClO (0.6%) + Tween-20 0.2% (v/v), con agitación moderada. Finalmente, se hicieron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril.

**Tratamiento 4 (T4).** - Los explantes se colocaron en SJ por 10 min y enjuagaron con agua corriente, después se sumergieron en antibióticos (Ampicilina 200 mg/L, Tetraciclina 200mg/L y Cefotaxima 15 mg/L) por 30 min y una solución con fungicidas (Shogun 0.001 mL/mL y fungoxyl 0.001 g/mL) por 20 min y enjuagados con agua destilada, consecutivamente durante 1 min se colocan en una solución EtOH al 70% (v/v) y se enjuagan con agua destilada. Durante 10 min se sumergen en una solución de NaClO al 0.6% + Tween-20 0.2% (v/v), con agitación moderada. Finalmente, se hicieron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril.

Los lavados 3 y 4 se sumergieron en una solución antioxidante estéril (ácido cítrico y ácido ascórbico 100 y 150 mg/L) para evitar la oxidación de los explantes; inmersión con dicha solución durante 10 min (posterior a los 3 enjuagues de agua des-ionizada) y segmentación de los explantes en proporciones de 1 cm<sup>2</sup> en cajas Petri. Una vez obtenidos los segmentos, éstos fueron colocados (parte axial) sobre el medio de cultivo. Por último, los explantes provenientes de una hoja serán empleados para evaluar un tratamiento consistente de 6 frascos, cada uno conteniendo 3 segmentos (n=18).

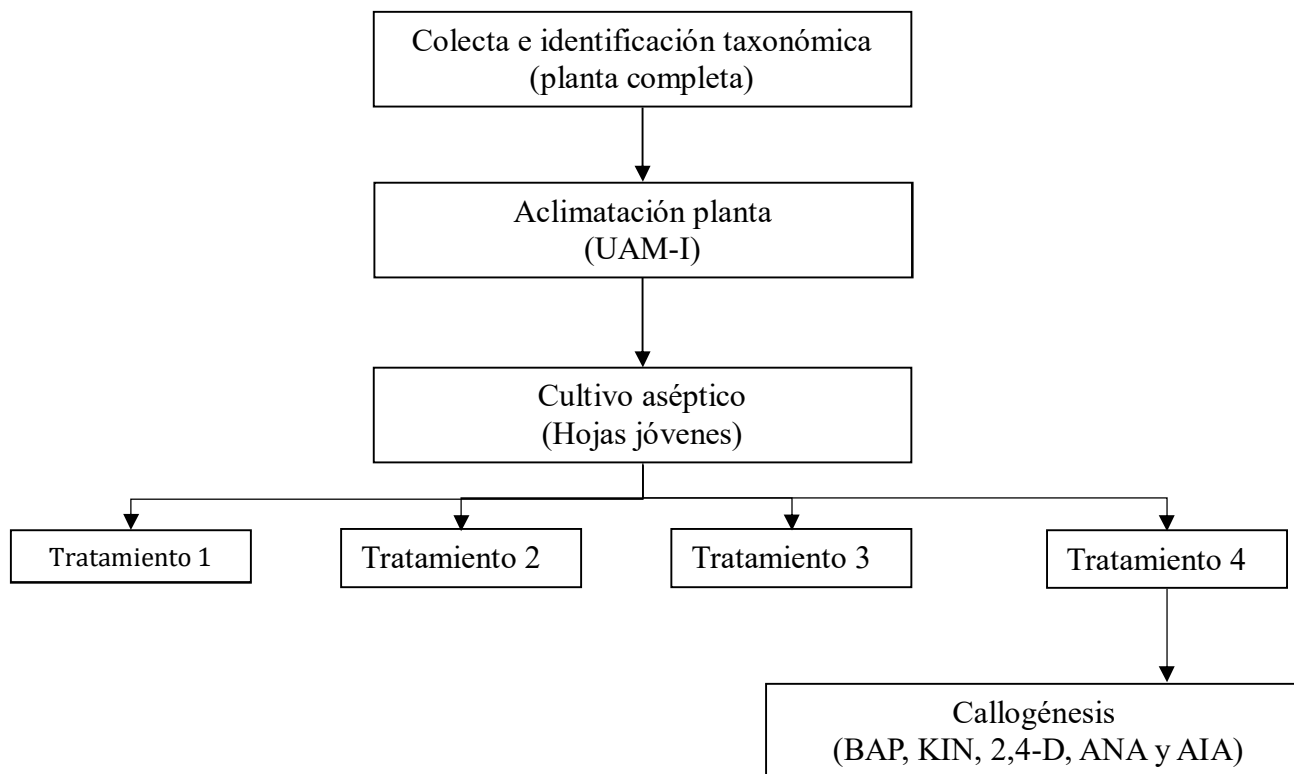


Figura 3 Diagrama del establecimiento de explantes asépticos y cultivos de callos

### 3.3. Callogénesis

Los explantes de hoja previamente desinfectados por el T4 y que no mostraron contaminación fueron trasladados a tubos (150 x 20 mm) con medio de cultivo, utilizando un explante por tubo, en total se realizaron 59 combinaciones RCV (5 tubos por combinación; n=5). Como medio base se utilizó el medio de cultivo MS complementado con 30.0 g/L de D-glucosa y 6.0 g/L de agar a pH 5.8. Los diferentes tratamientos se derivaron de la combinación de las auxinas (ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA)) y las citoquininas (6-bencilaminopurina (BAP), kinetina (KIN)). A diferentes concentraciones que iban desde 0.0 hasta 5.0 mg/L. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 psi durante 18 minutos. Los explantes se incubaron a 26±2 °C bajo fotoperiodo de 16 horas luz (32 µM/seg.m<sup>2</sup>) por 8 horas de oscuridad y se transfirieron a nuevo medio cada 30 días hasta la obtención de callos (Figura 3). Los

explantos que exhibían un callo o respuestas morfogénicas se expresaron como un porcentaje del total de explantes, que se determinó después de 30 días de cultivo. Los tratamientos que indujeron los porcentajes más altos se sub-cultivaron cada 30 días en medios frescos y se eligió el friable para poder realizar el cultivo de células en suspensión que se describe en el capítulo 2.

## **4. Resultados**

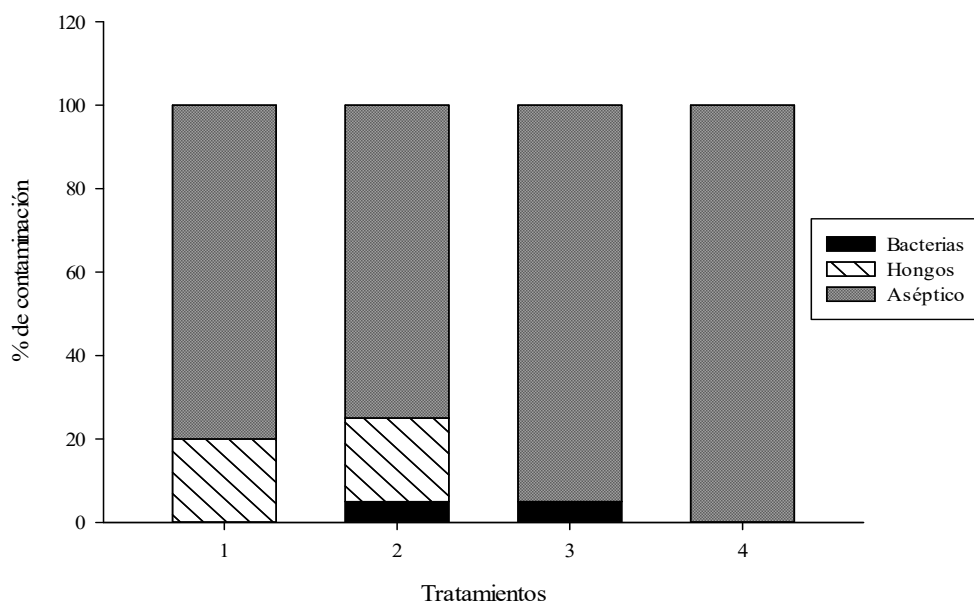
### **4.1. Colecta e identificación taxonómica del material vegetal.**

El material vegetal fue colectado en la Ciudad de México el 27 de junio del 2014. Un ejemplar de herbario se dejó en resguardo en el Herbario IMSSM del Centro Médico Nacional Siglo XXI para su identificación taxonómica, con el número de voucher 16252.

### **4.2. Preparación del cultivo aséptico**

De los 4 tratamientos realizados el T1 presentó contaminación por hongos en un 20%, se decidió aumentar la concentración del anti-fúngico para la eliminación de la contaminación por hongos. T2 inhibió la contaminación por hongos, pero se presentó un 5% de contaminación por bacterias, al observar esta contaminación se agregó una mayor cantidad de antibiótico. Después el T3 permaneció la contaminación por bacterias (5%), esto se debe a que la cantidad de antibióticos agregada no fue suficiente, para el T4 se aumentó la concentración de antibiótico y mantuvimos la de anti-fúngicos. Finalmente, el T4 mostró 100% de asepsia, siendo este el elegido para seguir con el proceso de calogénesis (Figura 4).





**Figura 4** Porcentaje de asepsia según los tratamientos utilizados. Cada grupo está representado como la media ( $\pm$ ). n=20

Una vez obtenidos explantes asépticos se procedió a la inducción de callo con diferentes RCV. Revisada la literatura, no se encontró ningún reporte para la formación de callo en la especie vegetal *C. chayamansa*, por lo que en primera instancia se evaluó la mezcla de una auxina y una citoquinina.

### 4.3. Inducción de callo.

Para la producción de callo se utilizaron hojas inmaduras ( $1 \text{ cm}^2$ ); sin embargo, se observó que los explantes de hojas presentaban oxidación lo que dificultó drásticamente su crecimiento. Para resolver estos problemas, se añadió una solución antioxidante (100 mg/L de ácido cítrico y 150 mg/L de ácido ascórbico) al medio de cultivo. Además, esta solución antioxidante se utilizó durante el enjuague y corte de los explantes. Una vez resuelto el problema de oxidación de los explantes se procedió a realizar las distintas combinaciones de una auxina con una citoquinina a distintas concentraciones (desde 0 a 5 mg/L) en total 9 combinaciones por tratamiento (Tabla 1). Estas mostraron porcentajes de inhibición desde 0 hasta 100% sin embargo la formación de callo no aseguraba que estos fueran friables y posibles candidatos a pasar a medio líquido.

Tabla 1 Respuesta a la formación de callo de distintas combinaciones de RCV

Código de tratamiento	Reguladores de Crecimiento Vegetal					Inducción de callos (%)
	Auxinas (mg/L)			Citoquininas (mg/L)		
	2,4-D	ANA	AIA	BAP	KIN	
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0± 0.0 <sup>a</sup>
D <sub>0.5</sub> B <sub>0.5</sub>	0.5			0.5		75 ± 0.25 <sup>c</sup>
D <sub>0.5</sub> B <sub>2.5</sub>	0.5			2.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
D <sub>0.5</sub> B <sub>5.0</sub>	0.5			5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
D <sub>2.5</sub> B <sub>0.5</sub>	2.5			0.5		75 ± 0.25 <sup>c</sup>
D <sub>2.5</sub> B <sub>2.5</sub>	2.5			2.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
D <sub>2.5</sub> B <sub>5.0</sub>	2.5			5		100 ± 0.0 <sup>d</sup>
D <sub>5.0</sub> B <sub>0.5</sub>	5			0.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
D <sub>5.0</sub> B <sub>2.5</sub>	5			2.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
D <sub>5.0</sub> B <sub>5.0</sub>	5			5		100 ± 0.0 <sup>d</sup>
N <sub>0.5</sub> B <sub>0.5</sub>		0.5		0.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
N <sub>0.5</sub> B <sub>2.5</sub>		0.5		2.5		75 ± 0.25 <sup>c</sup>
N <sub>0.5</sub> B <sub>5.0</sub>		0.5		5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
N <sub>2.5</sub> B <sub>0.5</sub>		2.5		0.5		25 ± 0.25 <sup>b</sup>
N <sub>2.5</sub> B <sub>2.5</sub>		2.5		2.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
N <sub>2.5</sub> B <sub>5.0</sub>		2.5		5		75 ± 0.25 <sup>c</sup>
N <sub>5.0</sub> B <sub>0.5</sub>		5		0.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
N <sub>5.0</sub> B <sub>2.5</sub>		5		2.5		25 ± 0.25 <sup>b</sup>
N <sub>5.0</sub> B <sub>5.0</sub>		5		5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>0.5</sub> B <sub>0.5</sub>			0.5	0.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>0.5</sub> B <sub>2.5</sub>			0.5	2.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>0.5</sub> B <sub>5.0</sub>			0.5	5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>2.5</sub> B <sub>0.5</sub>			2.5	0.5		25 ± 0.25 <sup>b</sup>
I <sub>2.5</sub> B <sub>2.5</sub>			2.5	2.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>2.5</sub> B <sub>5.0</sub>			2.5	5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>5.0</sub> B <sub>0.5</sub>			5	0.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>5.0</sub> B <sub>2.5</sub>			5	2.5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>5.0</sub> B <sub>5.0</sub>			5	5		0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>0.5</sub> K <sub>0.5</sub>			0.5		0.5	0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>0.5</sub> K <sub>2.5</sub>			0.5		2.5	25 ± 0.25 <sup>b</sup>
I <sub>0.5</sub> K <sub>5.0</sub>			0.5		5	0.0± 0.0 <sup>a</sup>

I <sub>2.5</sub> K <sub>0.5</sub>	2.5	0.5	0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>2.5</sub> K <sub>2.5</sub>	2.5	2.5	0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>2.5</sub> K <sub>5.0</sub>	2.5	5	0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>5.0</sub> K <sub>0.5</sub>	5	0.5	0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>5.0</sub> K <sub>2.5</sub>	5	2.5	0.0± 0.0 <sup>a</sup>
I <sub>5.0</sub> K <sub>5.0</sub>	5	5	0.0± 0.0 <sup>a</sup>

De los 36 tratamientos evaluados, solo diez mostraron respuesta favorable para la formación de callo. Los tratamientos que mostraron 25% de formación de callo fueron cuatro (N<sub>2.5</sub> B<sub>0.5</sub>, N<sub>5.0</sub> B<sub>2.5</sub>, I<sub>2.5</sub> B<sub>0.5</sub> y I<sub>0.5</sub> K<sub>2.5</sub>), los que mostraron un 75% de formación de callo fueron cuatro (D<sub>0.5</sub> B<sub>0.5</sub>, D<sub>2.5</sub> B<sub>0.5</sub>, N<sub>0.5</sub> B<sub>2.5</sub>, y N<sub>2.5</sub> B<sub>5.0</sub>) y por último los que mostraron 100% de callogénesis fueron dos (D<sub>2.5</sub> B<sub>5.0</sub>, y D<sub>5.0</sub> B<sub>5.0</sub>). De los diez callos obtenidos solamente del tratamiento N<sub>5.0</sub> B<sub>2.5</sub> mostró un callo friable.

A la fecha, este es el primer estudio en establecer un cultivo de callos a partir de explantes de hoja de *C. chayamansa*. Estudios similares han descrito la inducción de callo con los RCV, BAP y 2,4-D en hipocotilos, tallos, nódulos y explantes de hojas de *Lopezia racemosa*, los explantes de hojas mostraron formación de callo con una combinación de 0.5 mg/L de BAP adicionado con 1.0 mg/L de 2,4-D; a partir de esto, se aisló el compuesto 6-O-palmitoil-3-O-β-D-glucopiranosilcampesterol, que mostró actividad antiinflamatoria (Salinas *et al.*, 2014). Otras especies de la familia Euphorbiaceae, como *M. esculenta*, produjeron callos en un 100% cuando se cultivaron meristemas apicales de brotes en medio MS suplementado con 0.1 mg/L de BAP, con 0.2 mg/L de ANA y 0.25 mg/L GA3 (Acedo, 2006). Por otro lado, *P. stipulatus* mostró formación de callo cuando se cultivaron segmentos nodales de explantes en condiciones de luz en medio MS complementado con ANA 5.0 mM y en condiciones de oscuridad en medio MS complementado con ANA y BAP 5.0 mM + N6- (2-isopentenil) adenina (2iP) (1.25 - 5.0 mM) (Catapan *et al.*, 2000).

## 5. Conclusiones

- El tratamiento 4 fue el que mostró el 100% de explantes asépticos,
- Se logró la formación de callos con diez de los 36 tratamientos evaluados.

## 6. Productividad



### Establishing a Callus Culture of *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh: A Species with Ethnopharmacological Value

Mariana Zuleima Pérez-González<sup>1,2</sup>, Aurelio Nieto-Trujillo<sup>1</sup>, Ignacio García-Martínez<sup>2</sup>, María Elena Estrada-Zúñiga<sup>3</sup>, Antonio Bernabé-António<sup>4</sup>, María Adelina Jiménez-Arellanes<sup>5</sup>, Francisco Cruz-Sosa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Autonomous Metropolitan University-Iztapalapa, Mexico

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering and Biochemistry, TESE, Mexico

<sup>3</sup>Faculty of Sciences, Autonomous University of the State of Mexico, Mexico

<sup>4</sup>Department of Wood, Pulp and Paper, University of Guadalajara, Mexico

<sup>5</sup>Unit of Medical Research in Pharmacology, Hospital of Specialties, México

\*Corresponding author: Francisco Cruz-Sosa, Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa Ciudad de México, México. Tel: +525558044714; Fax: +525558044712; Email: culhp@xanum.uam.mx

Citation: Pérez-González MZ, Nieto-Trujillo A, García-Martínez I, Estrada-Zúñiga ME, Bernabé-António A, et al. (2018) Establishing a Callus Culture of *Cnidoscopus chayamansa* McVaugh: A Species with Ethnopharmacological Value. *Adv Biochem Biotechnol*: ABIO-164. DOI: 10.29011/ABIO-164.000064

Received Date: 28 February, 2018; Accepted Date: 03 April, 2018; Published Date: 11 April, 2018

#### Abstract

*Cnidoscopus chayamansa* is a plant widely used as food with potential medicinal applications. Plant tissue culture enables the production of secondary metabolites from plants in a sustainable manner. The aim of this work was to establish a callus culture of *C. chayamansa* using leaf explants, which, in the future, can be used to obtain whole extracts or specific compounds of interest. Different concentrations and combinations of 6-Benzylaminopurine (BAP) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) in Murashige and Skoog (MS) culture medium were evaluated for their ability to support callus induction from immature leaf explants. Highest callus yield (100%) was achieved when leaf explants were incubated in MS medium supplemented with BAP (5.0 mg L<sup>-1</sup>) and 2,4-D (2.5 or 5.0 mg mL<sup>-1</sup>). A reduced rate of callus induction (75%) was observed when leaf explants were exposed to lower concentrations (0.5 mg L<sup>-1</sup>) of BAP or 2,4-D. The calluses obtained in this work can be used as a biotechnological alternative for *in vitro* propagation of *C. chayamansa* and for obtaining extracts or compounds with a possible pharmacological application.

**Keywords:** Chaya, *in vitro* culture, Medicinal plants, Plant growth regulators.

#### Introduction

*Cnidoscopus chayamansa*, commonly known as “tree spinach” or “chaya” in Central and South America, is a semi-perennial and semi-woody shrub. *C. chayamansa* is an important staple leafy vegetable for the autochthonous people of Mesoamerica. The nutritional value of *C. chayamansa* [1] and traditional medicinal and food use has been established in the literature [1,2]. As a food for freshwater fish, partial substitution of balanced feed with this leaf has been determined to be viable for tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) culture in the integrated agricultural-aquaculture systems in Yucatan, Mexico [3]. The

antioxidant capacity and phenolic content of the leaf extracts, in addition to anti-inflammatory and cardioprotective properties, has been extensively described in the literature [4-6]. Furthermore, the antioxidant and antimutagenic activity of a methanolic extract from the edible leaves of *C. chayamansa* has been detailed, in addition to its antidiabetic effects in diabetic rats [7,8]. A phytochemical profile, including flavonoids, phenolic acids, saponins, and alkaloids, and the antioxidant properties of fresh leaves were recently reported [8]. Antimycobacterial (MIC ≤ 50 µg mL<sup>-1</sup>), Antibacterial (*P. aeruginosa* and *E. coli*), Antiprotozoal (IC<sub>50</sub> ≤ 50 µg mL<sup>-1</sup>), and Anti-inflammatory (ED<sub>50</sub> = 1.66 mg car<sup>-1</sup> for the TPA model and 467.73 mg kg<sup>-1</sup> for the carragenine model) activities of the leaf extract (CHCl<sub>3</sub>: MeOH, 1: 1) have been published. Also, isomperol-3,7-dimethyl ether, 5-hydroxy-7-*S*,4'-

## 7. Referencias.

- Acedo, V. Z. 2006. Improvement of in Vitro Techniques for Rapid Meristem Development and Mass Propagation of Philippine Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz). *Journal of Food, Agriculture and Environment* 4(1): 220–24.
- Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., Lakhssassi, N. 2019. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. *Metabolites*, 9(11), 258.
- Calixto, J.B. 2005. Twenty-Five Years of Research on Medicinal Plants in Latin America: A Personal View. *Journal of Ethnopharmacology* 100(1–2): 131–34.
- Catapan, E., Luís, M., Da Silva, B., Moreno, F.N., Viana, A.M. 2002. Micropropagation, Callus and Root Culture of *Phyllanthus Urinaria* (Euphorbiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70(3): 301–9.
- Catapan, E., Otuki, M.F., Viana, A.M. 2000. In vitro culture of *Phyllanthus caroliniensis* (Euphorbiaceae). *Plant cell, tissue and organ culture* 62(3): 195-202.
- Cifuentes, R., Poll, E., Bresanni, R., Yurrita, R., Poll, E.M. 2010. Caracterización botánica, molecular, agronómica y química de los cultivares de Chaya (*Cnidocolus aconitifolius*) de Guatemala. *Revista de la universidad del Valle de Guatemala* 1-16.
- Ekor, M. 2014. The Growing Use of Herbal Medicines: Issues Relating to Adverse Reactions and Challenges in Monitoring Safety. *Frontiers in Neurology* 4: 1–10.
- Farag, M Mohammed M.S., Foud, I., Ahmed W.J., Mohamed M.S. 2015 The role of natural products in drug discovery and development. *World Journal of Pharmaceutical Research* 3(4): 22-33.
- Gandhi, S.G., Mahajan, V., Bedi, Y.S. 2015. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Planta*, 241(2): 303-317.
- Gutiérrez-Rebolledo, G.A., Garduño-Siciliano, L., García-Rodríguez, R.V., Pérez-González, M.Z., Chávez, M.I., Bah, M., Siordia-Reyes, G.A., Chamorro-Cevallos, G.A., Jiménez-Arellanes, M.A. 2017. Anti-Inflammatory and Toxicological Evaluation of *Moussonia Deppeana* (Schldl. & Cham) Hanst and Verbascoside as a Main Active Metabolite. *Journal of Ethnopharmacology* 187: 269-280.

- Islam, M.S., Ara, H., Ahmad, K.I., Uddin, M.M. 2019. A review on medicinal uses of different plants of Euphorbiaceae family. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 47-51.
- Konaté, K., Hilou, A., Mavoungou, J.F., Lepengué, A.N., Souza, A., Barro, N., Datté, J.Y., Batchi, B.M., Nacoulma, O.G. 2012. Antimicrobial Activity of Polyphenol-Rich Fractions from *Sida Alba* L. (Malvaceae) against Co-Trimoxazol-Resistant Bacteria Strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 11(1): 1–6.
- Kondamudi, R., Murthy, K. S.R., Pullaiah, T. 2009. Euphorbiaceae-a critical review on plant tissue culture. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 10(3): 313-335.
- Krogh, R., Kroth, R., Berti, C., Madeira, A.O., Souza, M.M., Cechinel-Filho, V., Delle-Monache, F., Yunes, R.A. 1999. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pescaprae* (L.) R. Br. *Die pharmazie*, 54(6): 464-466.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473–97.
- Murugesan, D., Deviponnuswamy, R. 2014. Potential anti-inflammatory medicinal plants-a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(4), 43-49.
- Pathania, S., Ramakrishnan, S.M., Bagler, G. 2015. Phytochemica: a platform to explore phytochemicals of medicinal plants. *Database*, 2015.
- Pérez-González, M.Z., Gutiérrez-Rebolledo G.A., Yépez-Mulia, L., Rojas-Tome I.S., Luna-Herrera, J., Jiménez-Arellanes M.A. 2017. Antiprotozoal, Antimycobacterial, and Anti-Inflammatory Evaluation of *Cnidioscolus Chayamansa* (Mc Vaugh) Extract and the Isolated Compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.89: 89-97.
- Pérez-Hernández, J., González-Cortazar, M., Marquina, S., Herrera-Ruiz, M. Meckes-Fischer, M., Tortoriello, J. Cruz-Sosa, F., Nicasio-Torres, M.P. 2014. Sphaeralcic Acid and Tomentin, Anti-Inflammatory Compounds Produced in Cell Suspension Cultures of *Sphaeralcea Angustifolia*. *Planta Medica* 80(2–3): 209–14.
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A. 2011. Influence of abiotic stress singles on secondary metabolites in plants. *Plant Sign Behavior* 6:1720–1731.
- Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on

- secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11): 1720-1731.
- Rao, S.R., Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2): 101-153.
  - Salinas, R., Arellano-García, J., Perea-Arango, I., Álvarez, L., Garduño-Ramírez M.L., Marquina, S., Zamilpa, A., Castillo-España, P. 2014. Production of the Anti-Inflammatory Compound 6-o-Palmitoyl-3-O- $\beta$ -D- Glucopyranosylcampesterol by Callus Cultures of *Lopezia Racemosa Cav.* (Onagraceae). *Molecules* 19(6): 8679–8690.
  - Sen, Tuhinadri, and Samir Kumar Samanta. 2014. Medicinal Plants, Human Health and Biodiversity: A Broad Review. In *Educational Technology and Society*, 59–110.
  - Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., Rocha-Sosa, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3): 355-363.
  - Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB). 2018. <https://smbb.mx/>
  - Steinmann, V.W. 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*, (61): 61-93.
  - Suslow, T., Thomas, B., Bradford, K. 2002. *Biotechnology provides new tools for plant breeding*. UCANR Publications.
  - Yue, W., Ming, Q.L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.J., Han, T., Qin, L.P. 2016. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology* 36(2), 215-232.
  - Yue, W., Ming, Q.L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.J., Han, T., Qin, L.P. 2016. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2): 215-232.
  - Zhang, R. Liu, Z.G., Li, C., Hu, S.J., Liu, L., Wang, J. P., Mei, Q.B. 2009. Du-Zhong (*Eucommia Ulmoides Oliv.*) Cortex Extract Prevent OVX-Induced Osteoporosis in Rats. *Bone* 45(3): 553–59.



En este capítulo se describe el proceso para llegar al cultivo de células en suspensión, la identificación y cuantificación de metabolitos mayoritarios por ccf y HPLC del extracto ANB.

## Capítulo II

Cultivos de células en suspensión y metabolitos mayoritarios



## 1. Antecedentes

En los últimos años la importancia de los MtS para la industria farmacéutica ha resultado de gran interés, principalmente en la posibilidad de alterar la producción de estos, dando origen a la biotecnología vegetal. Las tecnologías de cultivo de células vegetales se introdujeron a fines de la década de 1960 como una posible herramienta para estudiar y MtS de plantas utilizando diversas estrategias *in vitro*, una de ellas es el cultivo de células vegetales (Efferth, 2019).

### 1.1. Cultivo de células vegetales (CCV)

En 1934 surgió el primer informe, donde se describe que las células de plantas podrían ser cultivadas en medios sintéticos en un estado indiferenciado y parecían ser capaces de un crecimiento ilimitado. Durante las décadas de 1940 y 1960, los avances técnicos condujeron al desarrollo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales para investigar el comportamiento celular (incluida la citología, nutrición, metabolismo, morfogénesis, embriogénesis y patología) y la generación de plantas libres de patógenos (Efferth, 2019). Esto dio pauta a que por primera vez el material biológico de la planta podría usarse para la generación de cultivos de tejido vegetal, con gran impacto en el estudio genético y bioquímico para la biosíntesis de compuestos de origen natural y en algunos casos el CCV se utiliza para la producción a gran escala de MtS presentes en las plantas medicinales (Pérez-Hernández *et al.*, 2014; Niazian, 2019).

El CCV se puede iniciar con las semillas, las cuales son esterilizadas y germinadas bajo condiciones estériles en medio semisólido, el cual contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta. Posteriormente, la plántula en un medio estéril se utiliza para propagar el cultivo de células. Debido a que las condiciones de esterilización son complicadas, a menudo es más fácil la desinfección de la semilla en lugar de utilizar el tejido blando para iniciar el cultivo de tejidos. Los medios de cultivo más comunes son: Murashige y Skoog (MS), Hildebrandt (SH) Gamborg (B5), Blanco (WH), Nitsch y Nitsch (NN), Linsmaier y Skoog (LS), Schenk y Hildebrandt (SH), McCown y Lloyd (medio de planta leñosa, WPM). Cada uno de estos medios contiene minerales, vitaminas y una fuente de carbono, normalmente sacarosa. Aunque los CCV típicamente se inician en medio sólido, se requiere de medios líquidos para la producción a gran escala. Se ha observado que el

contenido de minerales y/o de la fuente de carbono en los medios de cultivo tiene un profundo impacto sobre la síntesis de metabolitos para la fabricación de fitofármacos (Priyadarshan, 2019)

### **1.2. Ventajas y aplicaciones de los CCV.**

Las principales ventajas del cultivo *in vitro* sobre los cultivos convencionales de plantas son que los metabolitos primarios (MtP) y/o MtS presentes en la planta se pueden producir bajo condiciones controladas, independientemente de los factores ambientales tanto bióticos (interacción con patógenos) como abióticos (clima, humedad, pH, tipo de suelo, luz ultravioleta y temperaturas extremas) regulando la tasa de síntesis, reduciendo costos y evitando la deforestación (Vanisree y Tsay, 2007).

### **1.3. Biotecnología de productos farmacéuticos de plantas naturales**

En la búsqueda de alternativas a la producción de compuestos medicinales deseables a partir de plantas, se descubre que los enfoques biotecnológicos, específicamente los CCV, tienen un potencial como complemento de la agricultura tradicional en la producción industrial de metabolitos bioactivos de plantas. El desarrollo y la comercialización de bioindustrias basadas en plantas medicinales en los países en desarrollo dependen de la disponibilidad de instalaciones e información sobre el bio-procesamiento, extracción, purificación y comercialización del potencial industrial de las plantas medicinales. Como el cultivo convencional de plantas medicinales es relativamente costoso, la producción de compuestos bioactivos por biotecnología es una excelente alternativa para la industria farmacéutica (Debnath *et al.*, 2006).

## **2. Objetivos particulares**

- establecer los cultivos de células en suspensión a partir de los callos.
- Realizar una cinética de crecimiento preliminar de los cultivos de células en suspensión.
- Preparar el extracto CHCl<sub>3</sub>:MeOH 1:1 vía maceración exhaustiva del material obtenido por cultivo de células en suspensión.
- Identificar y cuantificar los compuestos mayoritarios.

### 3. Metodología

#### 3.1. Establecimiento de cultivo de células en suspensión

El cultivo de células en suspensión de *C. chayamansa* se inició transfiriendo 6% de biomasa fresca de todos los callos obtenidos en el capítulo I (N<sub>2.5</sub> B<sub>0.5</sub>, N<sub>5.0</sub> B<sub>2.5</sub>, I<sub>2.5</sub> B<sub>0.5</sub>, I<sub>0.5</sub> K<sub>2.5</sub> D<sub>0.5</sub> B<sub>0.5</sub>, D<sub>2.5</sub> B<sub>0.5</sub>, N<sub>0.5</sub> B<sub>2.5</sub>, N<sub>2.5</sub> B<sub>5.0</sub> D<sub>2.5</sub> B<sub>5.0</sub>, y D<sub>5.0</sub> B<sub>5.0</sub>), en 80 mL de medio de cultivo MS líquido complementado con *D*-glucosa 30 g/L y los mismo RCV (respectivamente). Los cultivos se incubaron a 26±2 °C, bajo fotoperiodo de 16 horas luz 33 (intensidad luminosa de 32 μM/seg.m<sup>2</sup>) por 8 horas de oscuridad en un agitador orbital a 110 rpm (Estrada-Zúñiga, *et al.*, 2016).

El desarrollo de las suspensiones se evaluó registrando las características de color, disgregación del callo y crecimiento durante el establecimiento de la suspensión celular. La biomasa celular se filtró en condiciones de esterilidad cada 30 días y fue sub-cultivada en el mismo medio y condiciones de cultivo. Cabe señalar que, la única línea celular que proliferó en medio líquido fue N<sub>5.0</sub> B<sub>2.5</sub> y esta fue la que se utilizó para realizar la cinética de crecimiento (Figura 5).

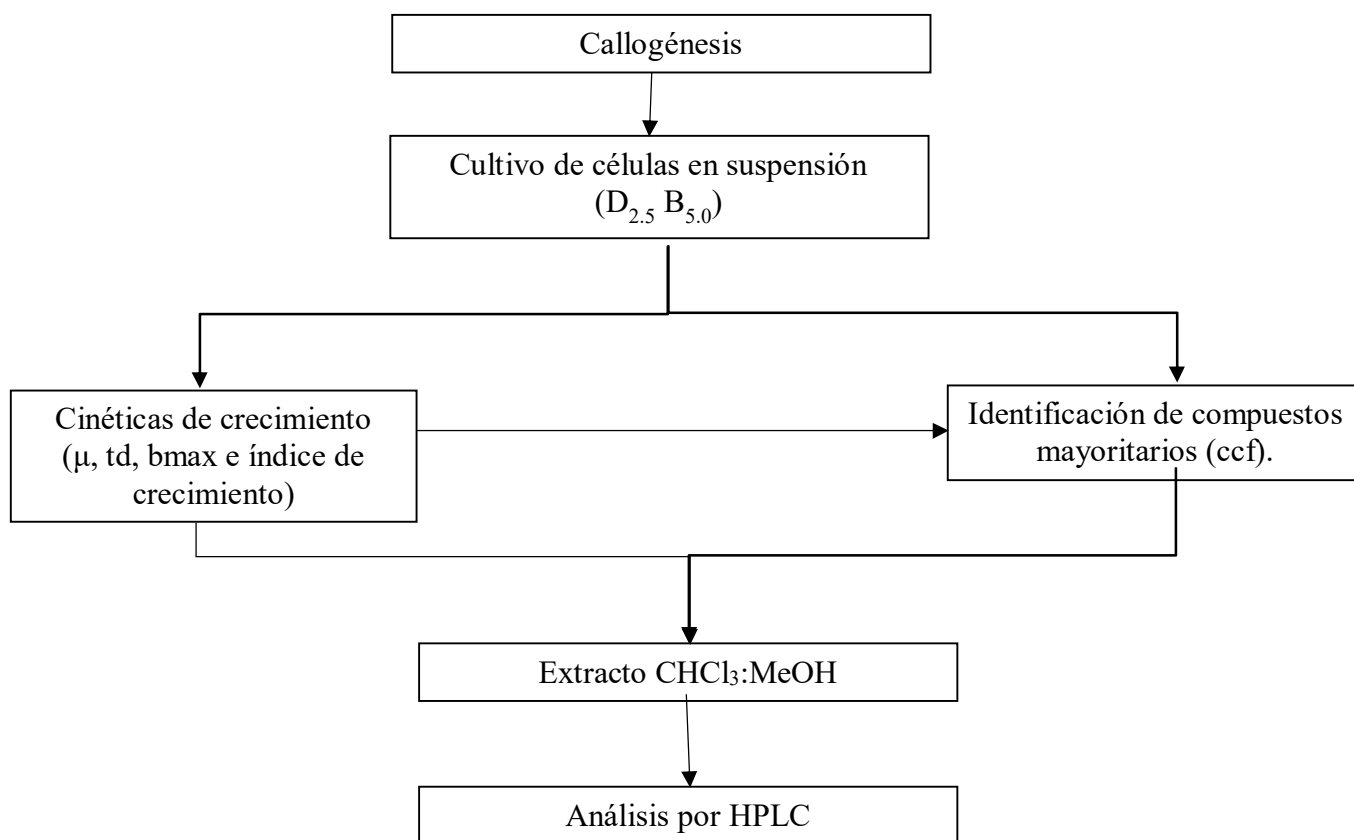


Figura 5 Diagrama de establecimientos de cultivos de células en suspensión e identificación de metabolitos

### 3.2. Optimización de las condiciones de cultivos en suspensión.

La cantidad de inoculo inicial es de gran importancia para estandarizar la producción células en suspensión de *C. chayamansa*. En este caso se utilizó un inoculo inicial del 6% para todos los cultivos y se realizó una tinción del cultivo de células en suspensión en el que se observó en un microscopio óptico (Olympus) la morfología, tamaño y aglomeración celular.

### 3.3. Cinéticas de crecimiento

Este parámetro se determinó durante 60 días registrando el peso fresco (PF) y el peso seco (PS) cada cinco días. La biomasa de cada matraz ( $n=3$ , por cada punto de la cinética) se filtró al vacío en un embudo Büchner (papel filtro Whatman No.1) en condiciones de esterilidad. La biomasa recuperada se lavó con agua destilada esterilizada para eliminar los residuos del medio; después de medir el PF, la biomasa se secó en estufa a 55°C y se determinó el PS (Nicasio-Torres *et al.*, 2012).

Se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento:

- 1) La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) calculada a través del logaritmo de los pesos secos de las biomásas secas determinadas durante la fase exponencial contra tiempo,
- 2) Tiempo de duplicación (td), que es el tiempo requerido para duplicar la biomasa y se determinó mediante la siguiente ecuación  $td = \ln 2 / \mu$ ,
- 3) El índice de crecimiento se determinó calculando la biomasa máxima obtenida menos el inoculo entre el inoculo; el rendimiento de la fuente de carbono entendido como los gramos de biomasa seca producida por cada gramo de fuente de carbohidratos totales suplementados al medio de cultivo.

La concentración de azúcares totales se determinó a través del método Fenol-Sulfúrico descrito por Dubois en 1956 con modificaciones y se realizó una curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración. Para esto se prepararon soluciones de 1-40 g/L utilizando D-glucosa de 1-40 g/L como estándar (Anexo 1). Como blanco para las lecturas se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento. Se mezclaron 2 mL de muestra con 2 mL de fenol al 5% en tubos digestores y se colocaron en una gradilla sumergida en un baño de agua fría. A los tubos se les añadieron 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se dejaron reposar por 15 min y se analizaron en un espectrofotómetro (Cecil 3000 series) a una longitud de onda de 490

nm. Los ensayos se realizaron por triplicado para obtener valores promedios (Estrada-Zúñiga *et al.* 2009).

#### **3.4. Identificación de metabolitos mayoritarios.**

Se realizaron los extractos CHCl<sub>3</sub>:MeOH [1:1] de cada punto de la cinética de crecimiento celular y se utilizó la técnica de ccf, en placas de aluminio de silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck Millipore), para la identificación de triperpenos y se reveló con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%, para la identificación de compuestos fenólicos, las placas se revelaron con agentes químicos cromóforos (Ácido difenilbórico aminoetiléster 1%) / Polietilenglicol (NP-PEG) para posteriormente observarlos en una lámpara UV<sub>365 nm</sub>, una vez observado se espera observar coloraciones fluorescentes azules (Pérez-González *et al.*, 2017). Una vez identificados los metabolitos mayoritarios se realizó la cuantificación por HPLC.

#### **3.5. Cuantificación e identificación de metabolitos secundarios por HPLC**

El equipo utilizado durante la identificación y cuantificación de MtS del extracto CHCl<sub>3</sub>:MeOH de *C. chayamansa* fue un cromatógrafo líquido de alta (HPLC) marca Agilent Technologies 1100 series con un G1311A Quatpump (Altech Co., EE. UU). Equipado con un G1315B DAD (Alltech Co., EE. UU.), y una columna NUCLEODUR C18 (Pirámide 50 × 3 mm). Las muestras del extracto de cada punto de la cinética y estándares se filtraron con una membrana de nailon (0.2 µm), se inyectaron alícuotas de 20 µL, por último, el software de cromatografía CHEMSTATION (Rev. A.08.03; Agilent Technologies) se utilizó para adquirir todos los datos del DAD. El área del pico que se muestra en el cromatograma de cada solución estándar se usó para identificar y cuantificar los compuestos presentes en el extracto. Los resultados se expresaron como mg de compuesto por gramo de extracto seco (mg compuesto/por gramo de extracto seco).

#### **3.6. Identificación de compuestos fenólicos.**

Los estándares utilizados fueron linarina, siringina, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, ácido cafeico, ácido cinámico, quercetina, kaemperol, rutina, ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido gálico y naringenina (marca Sigma). Se realizó una mezcla de los estándares y se diluyeron en MeOH, la fase móvil fue agua acidificada con ácido acético al 0.3% y se utilizó un flujo en gradiente de 0.100 a 0.700 ml/min a 300 nm con un tiempo de ejecución de 60 min.

### **Cuantificación de acetato de $\alpha$ - y $\beta$ - de amirina (AA)**

El estándar de AA utilizado (Sigma S707023) se diluyó en MeOH, este compuesto es la mezcla de acetato de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina. En primer lugar, se preparó la curva de calibración ( $\alpha$ ,  $y = 1970.1x + 272.45$ ;  $R^2 = 0.9984$ ;  $\beta$ ,  $y = 3654.6x + 545.52$ ;  $R^2 = 0.9983$ ) a concentraciones de 78 a 5000  $\mu\text{g/mL}$  (Anexo 2). Las condiciones del HPLC empleadas fue las descritas por Khan *et al.* (2017), con algunas modificaciones. La fase móvil fue la mezcla de isopropanol y acetonitrilo (1:24), con flujo de 0.9 mL/min (0-10 min), 0.7 mL/min (11-15 min) y 0.9 mL/min (16-20 min) a 210 nm, con un tiempo de corrida de 20 min. La temperatura de la columna se mantuvo a 30°C.

### **3.7. Cuantificación de escopoletina (SCO)**

El estándar de SCO utilizado (Sigma S2500) se solubilizó en MeOH y se empleó para trazar la curva de patrón ( $y = 14354x + 583.88$ ;  $R^2 = 0.9988$ ) a concentraciones de 46 a 3000  $\mu\text{g/mL}$  (Anexo 3). Las condiciones del HPLC fueron las descritas por Pérez-Hernández *et al.*, (2014), con algunas modificaciones. Como fase móvil se empleó en una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O acidificada al 0.1% con ácido fórmico (3:7), que se realizó de forma isocrática con flujo de 1 mL/min a 366 nm, con un tiempo de corrida de 30 min. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C. El software de cromatografía CHEMSTATION (Rev. A.08.03; Agilent Technologies) se utilizó para adquirir todos los datos del DAD. Los resultados se expresaron como mg de SCO por gramo de extracto seco (mg SCO/por gramo de extracto seco).

### **3.8. Cuantificación de acetato de lupeol (AL)**

El estándar AL (99,6% de pureza) se aisló previamente del extracto orgánico de *C. tehuacanensis*, fue proporcionado por la Unidad de Investigación Médica en Farmacología (UIMF), Hospital de Especialidades del IMSS. El AL fue solubilizado en una mezcla de CHCl<sub>3</sub>: MeOH [1:1], con el cual se preparó la curva patrón ( $y = 17518x + 1560.3$ ;  $R^2 = 0.9958$ ) a concentraciones de 62.5 a 2000  $\mu\text{g/mL}$  (Anexo 4). Las condiciones del HPLC fueron las descritas por Khan *et al.*, (2017), con algunas modificaciones. La fase móvil fue una mezcla de isopropanol y acetonitrilo [1:24], en forma isocrática con velocidad de flujo de 0.9 mL/min a 210 nm y tiempo de corrida de 20 min. La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C.

### 3.9. Obtención del extracto a partir de cultivos de células en suspensión (CNIII)





El material vegetal seco de los cultivos de células en suspensión se extrajo 3 veces por maceración exhaustiva con CHCl<sub>3</sub>:MeOH a temperatura ambiente por 6 h. El extracto se filtró y concentro a presión reducida acoplada a vacío. Mediante este proceso se obtuvieron 54.4 g de extracto con un rendimiento del 9.9% a partir de 548 g de material seco.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Establecimiento del cultivo de células en suspensión

Los callos utilizados para establecer los cultivos de células en suspensión fueron los obtenidos con las combinaciones N<sub>2.5</sub> B<sub>0.5</sub>, N<sub>5.0</sub> B<sub>2.5</sub>, I<sub>2.5</sub> B<sub>0.5</sub>, I<sub>0.5</sub> K<sub>2.5</sub> D<sub>0.5</sub> B<sub>0.5</sub>, D<sub>2.5</sub> B<sub>0.5</sub>, N<sub>0.5</sub> B<sub>2.5</sub>, N<sub>2.5</sub> B<sub>5.0</sub> D<sub>2.5</sub> B<sub>5.0</sub>, y D<sub>5.0</sub> B<sub>5.0</sub>, solo cuatro combinaciones mostraron friabilidad y disgregación en medio líquido (Tabla 2).

Tabla 2 Características de callos formados con las combinaciones elegidas para cultivo de células en suspensión.

Combinación	Callo	Características
N <sub>0.5</sub> B <sub>2.5</sub>		Aglomerados con pequeñas partes oxidadas coloración verde pardo
N <sub>0.5</sub> B <sub>2.5</sub>		Aglomerado coloración verde pálido y con partes oxidadas
N <sub>0.5</sub> B <sub>2.5</sub>		Friable al tacto, coloración verde pálido y con partes oxidadas
N <sub>0.5</sub> B <sub>2.5</sub>		Aglomerado coloración verde pálido y con partes oxidadas

Una vez transferidos los callos a medio líquido MS adicionado con glucosa los cultivos produjeron diferentes cantidades de biomasa al día 30. Las combinaciones N<sub>0.5</sub> B<sub>2.5</sub> produjeron 420 mg/L de biomasa seca, N<sub>2.0</sub> B<sub>0.5</sub> (176.9 mg/L), N<sub>2.5</sub> B<sub>5.0</sub> (408.3 mg/L), finalmente N<sub>5.0</sub> B<sub>2.5</sub> (294.5 mg/L) (Figura 6). Las combinaciones N<sub>0.5</sub> B<sub>2.5</sub> y N<sub>2.5</sub> B<sub>5.0</sub>, fueron las que mostraron mayor formación de biomasa; sin embargo, la combinación N<sub>0.5</sub> B<sub>2.5</sub>, presentó demasiada aglomeración y oxidación en el cultivo celular. Por otro lado, la combinación N<sub>2.5</sub> B<sub>5.0</sub>, presentó aglomeración y formación de agregados, sin embargo, al ser sub cultivados los agregados fueron disminuyendo el tamaño, y este fue el cultivo elegido para seguir con la cinética de crecimiento (Figura 7a).

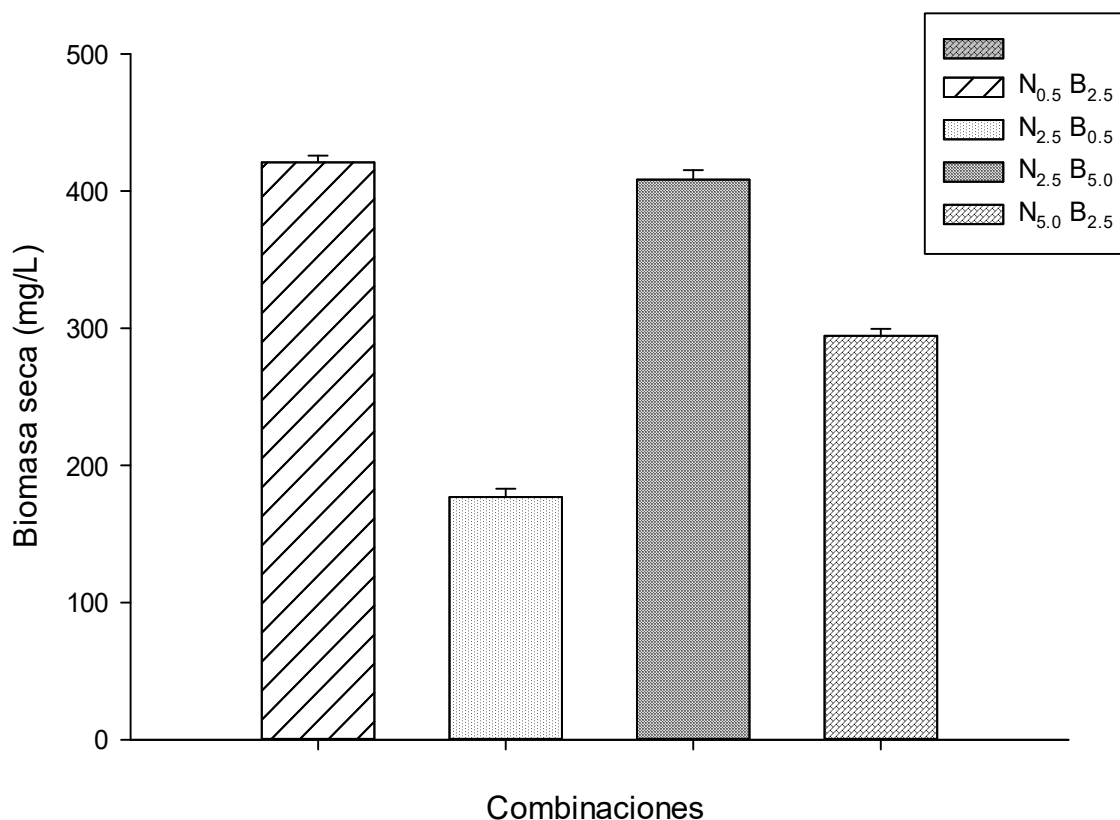


Figura 6 Biomasa obtenida con distintas combinaciones de RCV. Cada grupo está representado como la media ( $\pm$ ) y su error estándar (e.e.). n=5

#### 4.2. Optimización del cultivo de células en suspensión

Una vez establecido el cultivo de células en suspensión a partir del callo con el tratamiento N<sub>2.5</sub> B<sub>5.0</sub>, se acondiciono el medio MS, adicionando *D*-glucosa más los mismos RCV a las mismas concentraciones que en el callo. Se realizaron cinco sub-cultivos cada 30 días con 6% de inóculo inicial en los cuales se observó que el crecimiento de la biomasa fue constante,



y los agregados disminuyeron de tamaño, este cultivo fue denominado como ANB. Se realizó la observación microscópica de las células en fresco para conocer el estado de las células, observando que el cultivo tenía una uniformidad celular ya que se mostraban agregados pequeños de  $5 \pm 2$  células por agregado. (Figura 7b). Debido a que el cultivo ANB proviene de una planta leñosa se sabe que este tipo de plantas suelen formar agregados en cultivos de células en suspensión (Phillips y Garda, 2019).

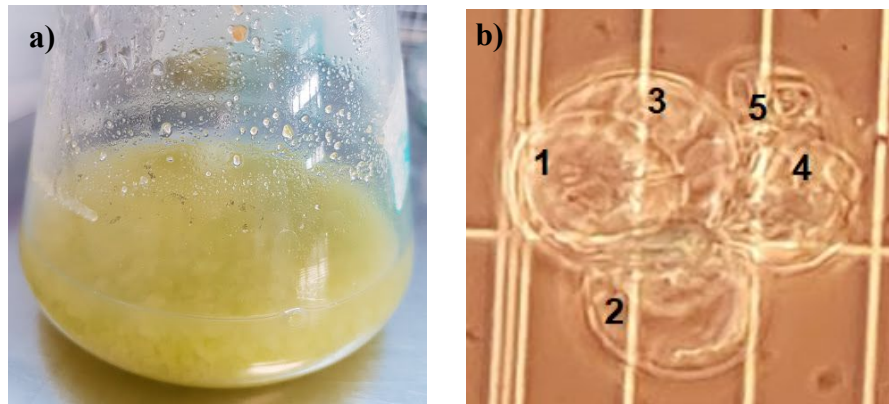


Figura 7 a) Cultivo de células en suspensión de *C. chayamansa* empleando un inóculo del 6% de callos derivados de explantes de hoja con ANA (2.5 mg/L) y BAP (5 mg/L); b) Células vegetales del cultivo vistas en el microscopio (20X)

#### 4.3. Cinética de crecimiento celular

La cinética establecida para el cultivo de células en suspensión fue de tipo lote con duración de 60 días, aplicando inóculos del 6%. Se observó una fase de adaptación del día 0 al 19, posteriormente se mostró la fase logarítmica del día 20 al 40 y finalmente la fase estacional hasta el día 60. La producción máxima de biomasa celular fue de 4.60 g/L al día 40 (Figura 8), correspondiente a  $IC = 5.63$ . A partir de la fase logarítmica se determinaron los siguientes parámetros, velocidad de crecimiento celular ( $\mu = 0.082 \text{ d}^{-1}$ ) y tiempo de duplicación ( $td = 8.45 \text{ d}$ ).

Los valores de biomasa fueron comparados con la cantidad de *D*-glucosa residual mostrando que al paso de los días la *D*-glucosa residual disminuía, por lo que se puede decir que el cultivo de células en suspensión es dependiente de la cantidad de la fuente de carbono.

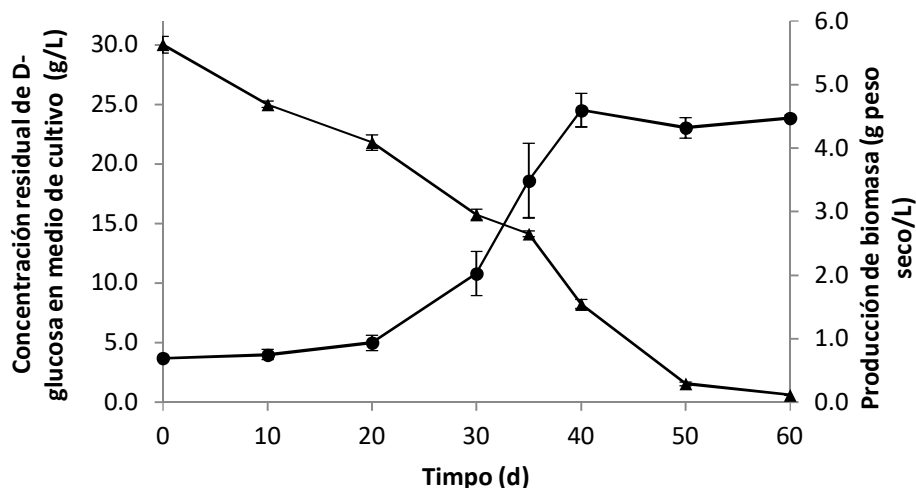


Figura 8 Caracterización del crecimiento del cultivo en suspensión celular de *C. chayamansa* durante los 60 días de incubación. ● Producción de biomasa y ▲ concentración de D-glucosa en medio de cultivo residual. Todos los resultados se presentan como las medias  $\pm$  DS (indicado por barras verticales). Las medias  $\pm$  DS seguidas por la misma letra no fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) después del análisis estadístico ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Student Newman Keuls (SNK) ( $p < 0,05$ ).

A la fecha no existían informes sobre cultivos de células en suspensión de *C. chayamansa*, sin embargo, se ha informado que una especie de la misma familia (Euphorbiaceae), *J. curcas*, mostró un valor  $\mu$  de  $0.15 \text{ d}^{-1}$  y un tiempo de duplicación celular de 4.8 d. Los cultivos en suspensión se establecieron a partir de semillas utilizando un método de descomposición enzimática, sin un paso previo para la inducción de callos ni la adición de RCV (Laura *et al.*, 2018). Otro estudio reveló que la suspensión de células de *J. curcas* se estableció fácilmente usando 2,4-D (0.5 mg/L), mostrando una biomasa máxima de 11.13 g/L, un tiempo de duplicación de 7.5 d, y un valor  $\mu$  de  $0.092 \text{ d}^{-1}$  (Bernabé-Antonio *et al.*, 2015). Estos últimos resultados en comparación con nuestros hallazgos mostraron valores de  $\mu$  y  $t_d$  similares, lo que indica que estas células en suspensión crecieron fácilmente, pero una tasa significativamente más lenta que el trabajo previo de *J. curcas* (Laura *et al.*, 2018), esto puede deberse al uso de diferentes RCV Bernabé-Antonio *et al.*, (2015). Estos resultados podrían aplicarse como un modelo predictivo para estudiar los mecanismos de crecimiento para los cultivos de células en suspensión de *C. chayamansa* en investigaciones posteriores.

#### 4.4. Identificación de metabolitos mayoritarios

Una vez obtenidos los extractos se realizó la placa ccf para detección de triterpenos y esteroides utilizando como estándares el acetato de moretenol, acetato de lupeol (aislados de

la planta silvestre, Pérez-González et al., 2018) y  $\beta$ -sitosterol (Sigma S1270), revelando con  $H_2SO_4$  al 10% y empleando como sistema de elución Hex:AcOET [95:5]. En el extracto se identificó  $\beta$ -sitosterol ( $R_f=0.10$ ) desde el día 5 y hasta el día 60, también se identificó al acetato de lupeol ( $R_f=0.21$ ) desde el día 20, pero la mancha mayoritaria del compuesto fue al día 40, para el acetato de moretenol ( $R_f=0.72$ ) se identificó como minoritario en el día 45 (Figura 9). Por otro lado, también se presentaron otras dos manchas mayoritarias en el día 40 que no fueron identificadas.

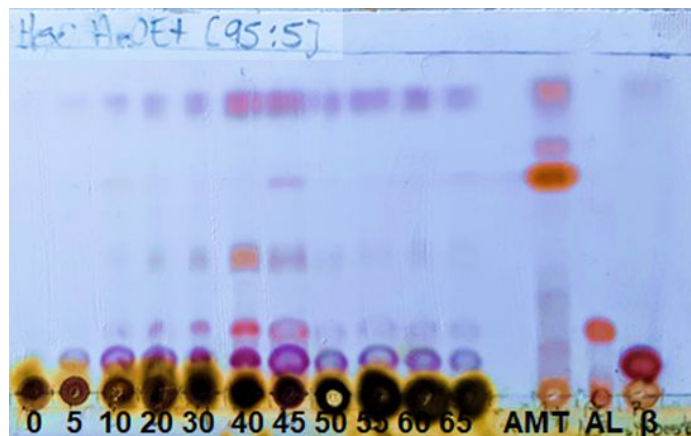


Figura 9 Perfil cromatográfico por ccf de los extractos de la cinética de crecimiento celular para la identificación de compuestos de naturaleza terpénica.

En otros reportes se identificaron acetato de lupeol, acetato de moretenol y moretenol en una de las fracciones mayoritarias de extracto  $CHCl_3:MeOH$  de la planta silvestre (Pérez-González *et al.*, 2017; 2018).

También se realizó la identificación de cumarinas en el extracto ANB comparándolas con referencias puras de esculetina, esculina, escopoletina y cumarina. El sistema utilizado para la elución de la placa fue  $CHCl_3:MeOH$  [97:3] y se observó al  $UV_{365\text{ nm}}$  únicamente se identificó una concordancia con SCO ( $R_f=0.62$ ) (Figura 10).

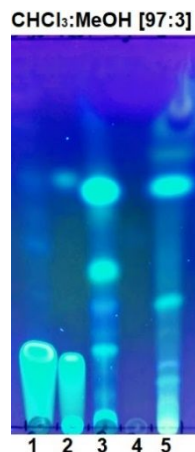


Figura 10 Cromatografía en capa fina para la identificación de cumarinas. Sistema de elución  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  [97:3], 1, Esculetina; 2, Esculina; 3, Escopoletina; 4, cumarina; 5, extracto de las células en suspensión al día 40, observadas a  $\text{UV}_{365\text{ nm}}$ .

Previamente se reporta la presencia de cumarinas en los extractos EtOH y de AcOET, mediante pruebas cualitativas (García-Rodríguez *et al.* 2014). También se reporta la presencia de SCO con un  $R_f = 0.49$  en el extracto  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  de hojas y tallos utilizando un sistema de elución en diferente proporción  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  [10:0.26] (Pérez-González *et al.*, 2019)

#### 4.5. Identificación de compuesto fenólicos por HPLC

De manera adicional, se realizó la inyección de una mezcla de compuestos fenólicos puros (ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumarico, rutina, ácido cinámico, quercetina y caempferol) en HPLC (Figura 11a) para poder determinar si algunos de estos estaban presentes en el extracto ANB. En el cromatograma del extracto ANB se identificó, ácido cafeico (2;  $t_R = 23.538$  min), ácido ferúlico (3;  $t_R = 26.392$  min), ácido cinámico (6;  $t_R = 34.047$  min) y quercetina (7;  $t_R = 26.392$  min) a una  $\lambda = 300$  nm, en pequeñas cantidades (Figura 11b).

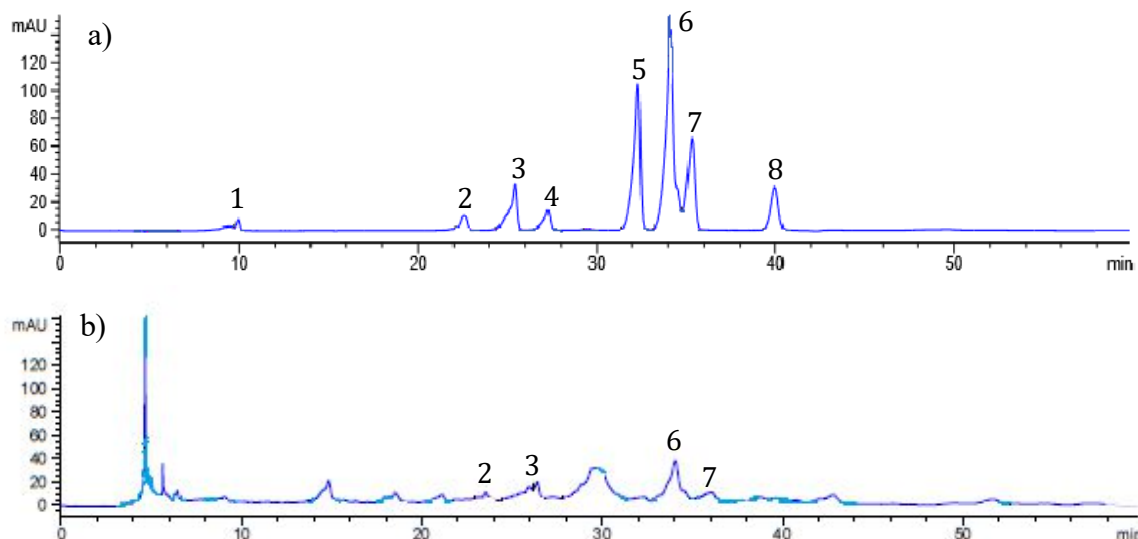


Figura 11 Cromatograma de HPLC para la identificación de fenoles en el extracto de ANB empleando algunos estándares comerciales de fenoles (Sigma). a) 1: ácido clorogénico, 2: ácido cafeico, 3: ácido ferúlico, 4: ácido *p*-cumárico, 5: rutina, 6: ácido cinámico, 7: quercetina, 8: caempferol b) extracto ANB.

En estudios previos se reportó la cuantificación por HPLC de quercetina (Figura 11) en hojas crudas (44.7µg/g) y en hojas cocidas (40.2µg/g) (Kuti and Konuru 2004). Otro reporte indica que el extracto acuoso de raíces de *C. chayamansa* contiene 0.35% de compuestos fenólicos, sin especificar qué tipo de compuesto (Jimoh *et al.*, 2009).

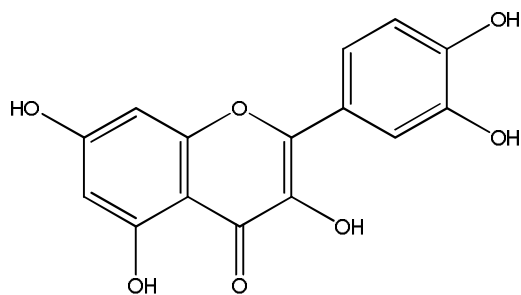


Figura 12 Estructura química de la quercetina.

#### 4.6. Cuantificación de acetato $\alpha$ y $\beta$ amirina

La cuantificación se realizó en HPLC, comparando con un estándar comercial puro de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina, el estándar comercial mostró que para el acetato de  $\alpha$ -amirina el  $t_R=11.39$  min, mientras que para el acetato de  $\beta$ -amirina fue de 11.390 (Figura 13a), por lo que se pudo realizar la cuantificación de ambos compuestos en el extracto ANB.

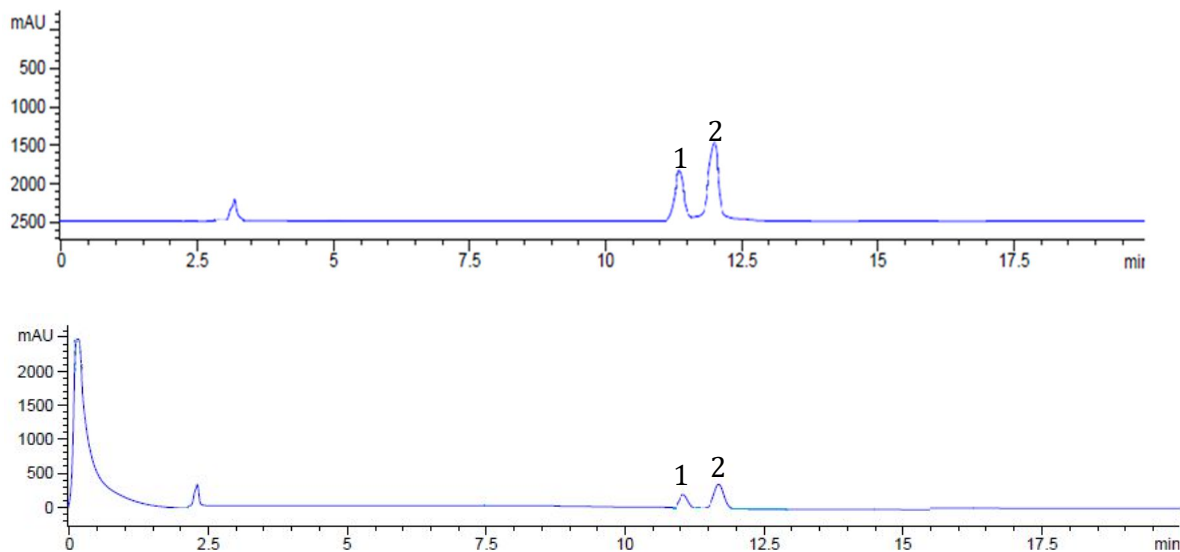


Figura 13 Cromatograma de HPLC para la identificación de AA en el extracto de ANB en comparación con el estándar comercial (Sigma). a) 1. Acetato de  $\alpha$ -amirina ( $R_t=11.391$ ) 2. Acetato de  $\beta$ -amirina ( $R_t= 11.39$  min) b) Extracto ANB, Acetato de  $\alpha$ -amirina; 2. Acetato de  $\beta$ -amirina

En el cromatograma del extracto se observa que los picos presentes muestran un tiempo de retención similar al del estándar comercial de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina (Figura 13b), en cuanto a la cuantificación se calculó que el extracto contiene 82.83 mg/g de acetato de  $\alpha$ -amirina y 82.31 mg/g de  $\beta$ -amirina (Figura 13b).

Previamente algunos autores reportan la identificación de acetato de  $\alpha$ -amirina (Figura 13a) y acetato de  $\beta$ -amirina) para diferentes especies de *Cnidoscolus*. En el extracto diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) de *C. aconitifolius*, se identificó y cuantificó ambos compuestos por medio de cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS), mostrando que el extracto contenía 3.3 mg de acetato de  $\alpha$ -amirina ( $t_R=12.73$  min) y 27.4 mg de acetato de  $\beta$ -amirina ( $t_R=12.88$  min) (Escalante-Erosa *et al.*, 2004). Por otro lado en el extracto  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  [1:1] de la especie *C. tehuacanensis* se identificó acetato de  $\beta$ -amirina en una de las fracciones mayoritarias encargadas de la actividad antiinflamatoria, esta fracción se identificó otro triterpeno llamado acetato de lupeol, calcularon la proporción de la mezcla y esta fue acetato de lupeol 90.4% y acetato de  $\beta$ -amirina, 8.9% (Jimenez-Arellanes *et al.*, 2018). Finalmente en la fracción primaria del extracto  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  de *Cnidoscolus chayamansa* se identificó por HPLC para ambos compuestos, acetato de  $\alpha$ -amirina ( $t_R= 16.81$  min) y acetato de  $\beta$ -amirina ( $t_R=17.25$  min) (Pérez-González *et al.* 2018), por otro lado, en el mismo extracto se cuantificó la

cantidad de acetato de  $\beta$ -amirina ( $t_R=22.097$  min) por GC-MS en una de las fracciones mayoritarias, la cantidad de acetato de  $\beta$ -amirina fue de 131.33 mg (41.46%) y esta estaba en mezcla con acetato de lupeol (56.67%) (Pérez-González *et al.*, 2019).

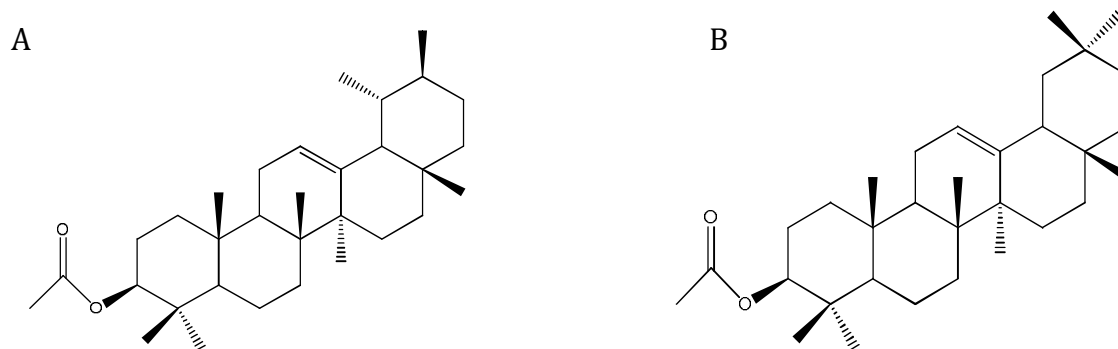


Figura 14 Estructura química de acetato de  $\alpha$ -amirina (A) y acetato de  $\beta$ -amirina (B).

#### 4.7. Cuantificación de escopoletina (SCO)

El análisis por HPLC, mostró que el estándar de SCO mostró  $t_R=21.952$  min (Figura 15a) mientras que en el extracto se detectó a  $t_R=22.002$  min (Figura 15b). La cuantificación de la SCO en el extracto ANB fue de 38.88 mg/g de extracto seco de ANB.

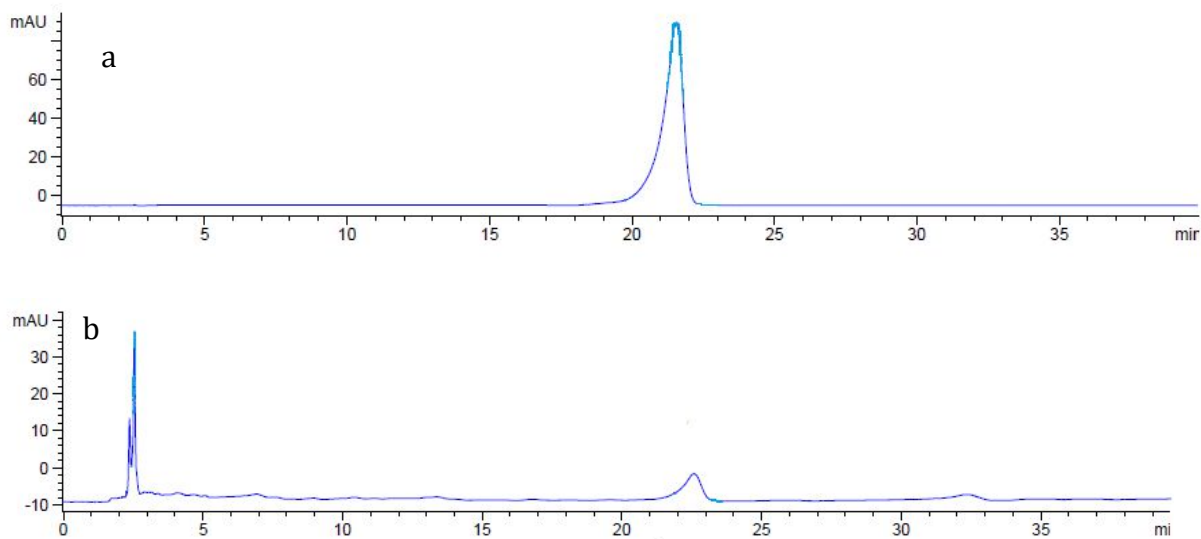


Figura 15 Cromatograma de HPLC para la identificación de SCO en el extracto de ANB en comparación con el estándar comercial (Sigma). a) Escopoletina ( $t_R=21.95$  min) b) Extracto ANB ( $t_R=22.00$  min).

Previamente se identificó SCO en *C. chayamansa* en el extracto CHCl<sub>3</sub>:MeOH de las hojas de *C. chayamansa* por ccf, utilizando un sistema de elución CHCl<sub>3</sub>:MeOH [10:0.26] con un R<sub>f</sub>=0.73, también reportaron la cuantificaron por HPLC (t<sub>R</sub>=21.57 min), el cual contiene 0.19 mg/g de extracto seco; además reportan el contenido de SCO en la fracción primaria, obteniendo 31.56 mg/g de fracción (Pérez-González *et al.*, 2019). Comparando los resultados del extracto de la planta silvestre con la cuantificación del extracto de cultivos de células en suspensión ANB, el extracto de cultivo celular contiene mayor cantidad de SCO (38.88 mg/g de extracto ANB seco) que el extracto de la planta silvestre (0.19 mg/g de extracto seco). Existen reportes donde proponen a la SCO como una alternativa para tratar padecimientos inflamatorios debido a su buena actividad biológica en diversos ensayos *in vivo* e *in vitro* (Wan *et al.*, 2019). Con los resultados obtenidos en este trabajo, se encontró que el cultivo de células en suspensión de *C. chayamansa* es una alternativa para la producción controlada de SCO, la cual puede ser utilizada para nuevos tratamientos en padecimientos inflamatorios.

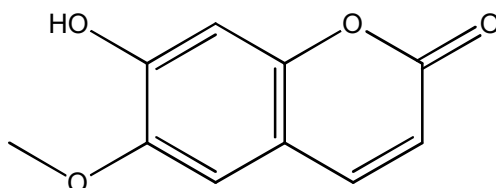


Figura 16 Estructura química de SCO

#### 4.8. Cuantificación de acetato de lupeol (AL)

El cromatograma de HPLC del extracto ANB mostró que las células tenían la capacidad de producir AL, ya que la concentración cambió a lo largo de los 60 días de cultivo. Respecto a la cantidad de biomasa, el contenido de AL fue mayor en el día 40 (Figura 17), en este día la fase de crecimiento cambia a fase estacional. Se ha descrito que los triterpenos no se consideran esenciales para el crecimiento y desarrollo normales de la planta, y aunque existen en plantas en forma simple no modificada, a menudo se acumulan como conjugados con carbohidratos y otras macromoléculas. Estas moléculas tienen importantes funciones ecológicas y farmacológicas, algunas evitan el ataque de plagas y le confiere resistencia contra patógenos y a la calidad de los alimentos en las plantas de cultivo. También tienen una



amplia gama de aplicaciones comerciales en los sectores de la biotecnología alimentaria, cosmética, farmacéutica e industrial (Thimmappa *et al.*, 2014).

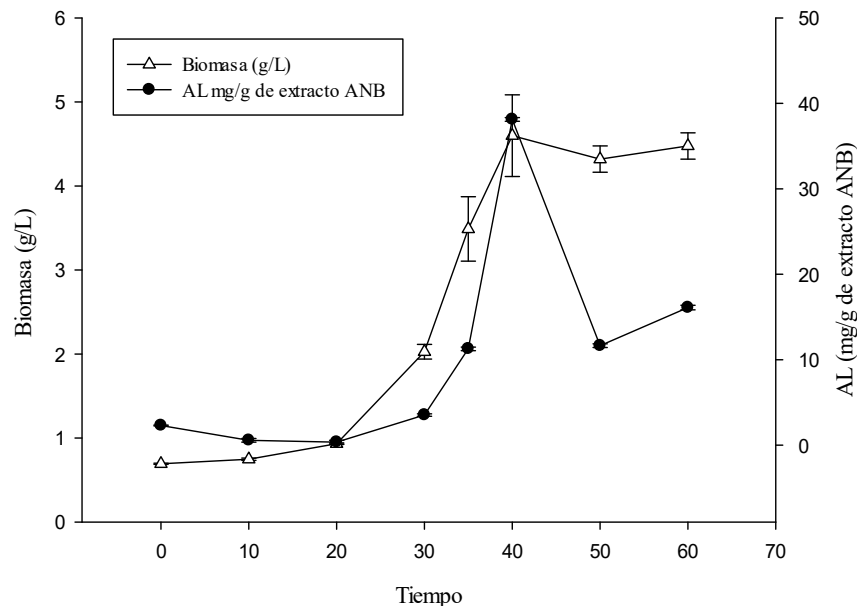
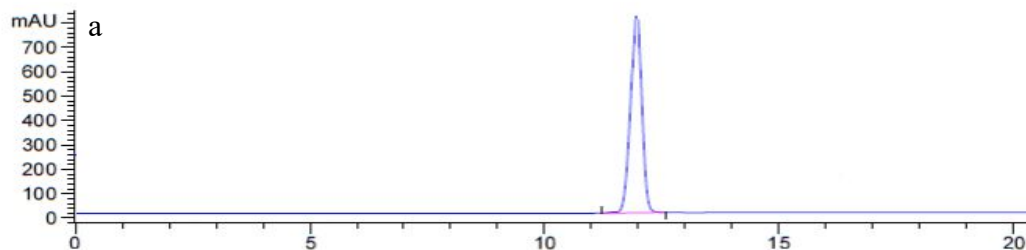


Figura 17 Cuantificación de Alen el extracto ANB obtenido durante el periodo de incubación (60 días).  
 ● Producción de biomasa y Δ Contenido de AL. Todos los resultados se presentan como las medias ± D.E. Las medias ± D.E. ( $p < 0.05$ ) ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Student Newman Keuls (SNK) ( $p < 0.05$ ).

La producción más alta de AL fue de 38.1 mg/g de extracto ANB seco en el día 40 (Figura 18a). Al comparar la producción de AL entre los cultivos celulares de *C. chayamansa* versus el contenido de este metabolito en las hojas de la planta silvestre; se observó que en este último material la producción fue más baja de  $2.9 \pm 0.2$  mg/extracto seco (Figura 18b).



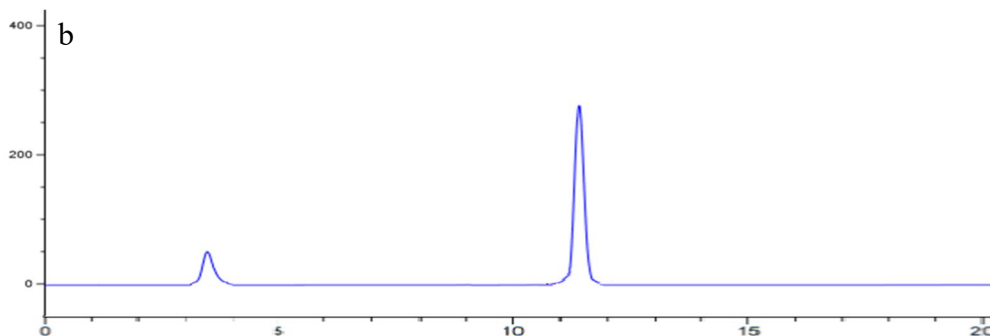


Figura 18 Cromatograma de HPLC para la identificación de SCO en el extracto de ANB en comparación con el estándar comercial (Sigma) a) Estándar AL ( $t_R=21.952$ ) b) Extracto ANB ( $t_R=22.002$ )

El extracto ANB del cultivo de células en suspensión es una fuente alterna y sustentable para la obtención de AL comparada con la cantidad encontrada en la planta silvestre. Este compuesto se le atribuye importante actividad antiinflamatoria y otras actividades biológicas (Lucetti *et al.*, 2010). Existen investigaciones de otras plantas como *Strobilanthes ciliatus* donde reportan que el extracto de éter de petróleo contiene 1.6 mg/g de extracto seco de AL (Venkatachalapathi y Subban, 2012). Antes de este reporte no existían informes sobre la producción de AL por cultivos de células en suspensión.

Este trabajo puede garantizar la disponibilidad de material vegetal para la obtención de compuestos de interés medicinal de alto valor, bajo en condiciones controladas que pueden representar una ventaja sobre las plantas silvestres. Se ha descrito que los metabolitos secundarios desempeñan funciones particulares e importantes en las plantas en respuesta a factores bióticos (contra infección por hongos, bacterias y virus) y abióticos (deficiencia mineral, sequía, radiación ultravioleta y bajas temperaturas) que alteran la biosíntesis de macromoléculas, causando una variación en el contenido de MtS (Moura *et al.*, 2019). El empleo de las técnicas biotecnológicas ha permitido obtener avances para obtener compuestos bioactivos con beneficios específicos para la salud y permiten establecer cultivos de células vegetales a gran escala en biorreactores para lograr un bioproceso comercial (Isah *et al.*, 2018).

## 5. Conclusiones

- La mejor combinación de RCV para obtener las células en suspensión de *C. chayamansa* fue: ANA + BAP (5 mg/L + 2.5 mg/L) con *D*-glucosa como fuente de carbono
- La cinética de crecimiento preliminar permitió calcular la velocidad de crecimiento ( $\mu = 0.078d^{-1}$ ), el tiempo de duplicación celular ( $td = 8.8 d$ ) biomasa máxima ( $b_{max} = 8.98 \pm 0.02 g/L$ ) e índice de crecimiento ( $IC = 6.23 \pm 0.056 g/L$ ).
- Se estableció que al día 40 pos-cultivo la producción de metabolitos secundarios como terpenos y cumarinas fue mayor, al realizar su detección por medio de ccf y se corroboró por análisis HPLC.
- Por ccf se detectó SCO,  $\beta$ -sitosterol, AL, acetato de moretenol y otros triterpenos en el extracto ANB.
- Por HPLC se detectaron ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinámico y quercetina en el extracto ANB.
- Por HPLC se cuantificó la cantidad de acetato de  $\alpha$ -amirina (82.83 mg/g de extracto ANB) y acetato de  $\beta$ -amirina (82.31 mg/g de extracto ANB).
- Por HPLC se cuantificó la cantidad de SCO en el extracto ANB dando como resultado 38.88 mg/g de extracto ANB seco, contenido mucho mayor que el de la planta silvestre (0.19 mg/g de extracto seco).
- Por HPLC se cuantificó la cantidad de AL en el extracto ANB dando como resultado 38.1 mg/g de extracto ANB seco, siendo mayor el contenido que el de la planta silvestre (2.9 mg/g de extracto seco). También se identificó el pico máximo de producción de AL en la cinética de crecimiento siendo este el día en el cual se realizaba la colecta de las células para la realización del extracto que se utilizó para las pruebas biológicas descritas en el capítulo III.

## 6. Productividad

South African Journal of Botany 125 (2019) 30–38



Contents lists available at ScienceDirect

### South African Journal of Botany

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/sajb](http://www.elsevier.com/locate/sajb)

## Lupeol acetate production and antioxidant activity of a cell suspension culture from *Cnidoscolus chayamansa* leaves

M.Z. Pérez-González <sup>a,e</sup>, A. Nieto-Trujillo <sup>a</sup>, G.A. Gutiérrez-Rebolledo <sup>a</sup>, I. García-Martínez <sup>b</sup>,  
M.E. Estrada-Zúñiga <sup>c</sup>, A. Bernabé-Antonio <sup>d</sup>, M.A. Jiménez-Arellanes <sup>e</sup>, F. Cruz-Sosa <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixo 186, Col. Vicentina, C.P. 09340 CDMX, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Av. Tecnológico s/n, Col. Valle de Anihuac, C.P. 55210 Ecatepec, Estado de México, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 15.5, Col. Piedras Blancas, C.P. 50200 Toluca, Estado de México, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Km 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Col. Las Agujas, C.P. 45010 Zapopan, Jalisco, Mexico

<sup>e</sup> Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, CMNS XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, C.P. 06720, CDMX, Mexico



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 September 2018

Received in revised form 11 April 2019

Accepted 15 June 2019

Available online 4 July 2019

Edited by P Baskaran

#### Keywords:

Medicinal plant

Growth regulators

Secondary metabolites

Lupeol acetate

HPLC

### ABSTRACT

*Cnidoscolus chayamansa* ('Tree spinach' or Chaya) produces lupeol acetate (LUAC) naturally. Cell culture may represent a viable alternative production method to sustainably use of natural resources. No studies have reported LUAC production *in vitro* or in Chaya cell culture. The aim of the study was to establish a *C. chayamansa* cell suspension culture, quantify LUAC production and evaluate the extract's antioxidant and antibacterial activity. To induce callus, immature leaves were cultured in Murashige and Skoog (MS) culture medium supplied with different combinations of auxin (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D;  $\alpha$ -naphthalene-acetic acid, NAA; indole-3-acetic acid, IAA or indole-3-butyric acid, IBA) and cytokinin (6-benzylaminopurine, BAP; or kinetin, KIN) at concentrations of 0.5, 2.5, and 5.0 mg/L. The higher percentage of callus induction (75.0%) and the best friable characteristic were exhibited when combining NAA (2.5 mg/L) and BAP (5.0 mg/L). This callus was used to establish a cell suspension culture, quantify LUAC production and evaluate the antioxidant and antibacterial activity. The maximum dry biomass (DW) of the cell suspension culture was 9.2 g/L at 40 days, growth index 5.63; specific growth rate ( $\mu$ ) of 0.082 days; and doubling time (td) at 8.45 days. Cells growth was related with *D*-glucose culture medium concentration. Cell suspension culture produced 38.1 mg LUAC/g extract at 40 days of culture, which was greater than the production in wild plant leaves (2.9 mg LUAC/g extract). Extracts exhibited moderate antioxidant activity ( $EC_{50}$  16.60 mg/mL) and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus coagulase*. Although the extracts exhibited only moderate biological activity, these produced a large amount of LUAC. Therefore, *C. chayamansa* cell suspension culture represents an alternative LUAC source instead of using the wild plant.

© 2019 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Cnidoscolus chayamansa* ethnobotany goes back to pre-Columbian times and was used as an ornamental, food and medicinal plant by Mayan families from Central and South America (Ross-Ibarra and Molina-Cruz, 2002). In Mexico, it is commonly known as Chaya, and its main uses is as an edible leafy and medicinal plant (Aguilar et al., 2010). Moreover, it is reported as a dietary supplement for tilapia culture, and it greatly improves the efficiency of food handling of an integrated agriculture and aquaculture system (Poot-López et al., 2010). As a food, its nutritional value has already been recognized as an important source of proteins, vitamins, minerals, and fatty acids (Ross-Ibarra

and Molina-Cruz, 2002; Kuti and Kuti, 1999). As a medicinal plant, several parts (stems, shoots, leaves, and roots) of *C. chayamansa* are used to counteract different diseases (e.g. diabetes, and inflammatory related diseases) (Valenzuela-Soto et al., 2015; Bautista-Cruz et al., 2011; Villareal-Ibarra et al., 2015; Ross-Ibarra and Molina-Cruz, 2002).

Recently, several *in vitro*, *in vivo* and phytochemical studies have been performed to investigate medicinal uses of *C. chayamansa*. For example, a clinical trial in women with early metabolic syndrome showed that the ingestion of an infusion of microwave-dehydrated leaves from this plant reduces hyperglycemia, although the infusion was not phytochemically characterized (Cárdenas-Ibarra et al., 2017).

Since the phytochemical review, different types of secondary metabolites have been determined from this species, such as cyanogenic glycosides, phenolic compounds (flavonoids, tannins, phenolic acids), terpenoids (saponins, triterpenoids, sterols), and alkaloids

\* Corresponding author.

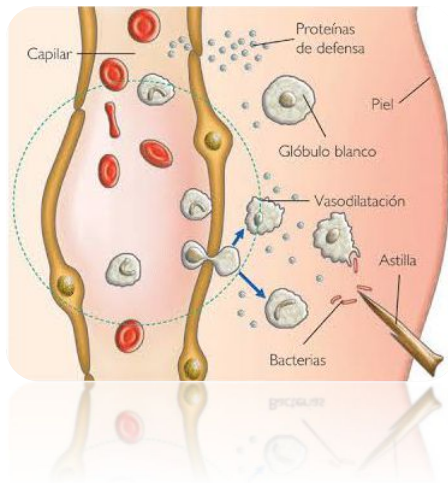
E-mail address: [cuhp@xanum.uam.mx](mailto:cuhp@xanum.uam.mx) (F. Cruz-Sosa).

## 7. Referencias

- Bernabé-Antonio, A., Álvarez, L., Buendía-González, L., Maldonado-Magaña, A., Cruz-Sosa, F. 2015. Accumulation and tolerance of Cr and Pb using a cell suspension culture system of *Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(1): 221-228.
- Debnath, M., Malik, C.P., Bisen, P.S. 2006. Micropropagation: a tool for the production of high-quality plant-based medicines. *Current pharmaceutical biotechnology*, 7(1): 33-49.
- Efferth, T. 2019. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*, 5(1), 50-59.
- Escalante-Erosa, F., Ortigón-Campos, I., Parra-Tabla, V., Peña-Rodríguez, L.M. 2004. Chemical composition of the epicuticular wax of *Cnidocolus aconitifolius*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48(1): 24-25.
- Estrada-Zúñiga, M.E., Aarland, R.C., Rivera-Cabrera, F., Bernabé-Antonio, A., Buendía-González, L., Cruz-Sosa, F. 2016. Micropropagation of *Buddleja cordata* and the content of verbascoside and total phenols with antioxidant activity of the regenerated plantlets. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2): 333-346.
- Estrada-Zúñiga, M.E., Cruz-Sosa, F., Rodríguez-Monroy, M., Verde-Calvo, J.R., Vernon-Carter, E.J. 2009. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97(1), 39.
- García-Rodríguez, R.V., Gutiérrez-Rebolledo, G.A. Méndez-Bolaina, E., Sánchez-Medina, A. Maldonado-Saavedra, O., Domínguez-Ortiz M.A., Vázquez-Hernández, M., Muñoz-Muñiz, O.D., Cruz-Sánchez, J.S. 2014. *Cnidocolus Chayamansa* Mc Vaugh, an Important Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cardioprotective Plant Used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 151(2): 937–43.
- Isah, T., Umar, S., Mujib, A. Sharma, M.P., Rajasekharan P.E., Zafar, N., Frunkh, A. 2018. Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 132, 239–265.
- Jimoh, F.O., Babalola, S.A., Yakubu, M.T. 2009. Assessment of the antioxidant potential of *Cnidocolous chayamansa*. *Pharmaceutical biology*, 47(9): 903-909.

- Khan, M.J., Saraf, S., Saraf, S. 2017. Anti-inflammatory and associated analgesic activities of HPLC standardized alcoholic extract of known ayurvedic plant *Schleichera oleosa*. *Journal of ethnopharmacology* 197: 257-265.
- Kuti, J.O., Konuru, H.B. 2004. Antioxidant capacity and phenolic content in leaf extracts of tree spinach (*Cnidoscolus spp.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1): 117-121.
- Laura, C.R., Rojas L.M, Urrea-Turjillo, A.I., Atehortúa G.L. 2018. Effect of Nutrients Starvation in the Cell Cycle Synchronization of Cell Suspension Cultures of *Jatropha Curcas* L. *Current Plant Biology* 13(2018): 23–31
- Lucetti, D.L., Lucetti, E.C., Bandeira, M.A.M., Veras, H.N., Silva, A.H., Leal, L.K.A., Viana, G.B. 2010. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *Journal of Inflammation*, 7(1): 1-11.
- Moura, L.F.W.G., da Silva Neto, J.X., Lopes, T.D.P., Benjamin, S.R., Brito, F.C.R., Magalhães, F.E.A., Florean E.O.P.T., Sousa D.O.B., Guedes, M.I.F. 2019. Ethnobotanic, phytochemical uses and ethnopharmacological profile of genus *Cnidoscolus* spp. (Euphorbiaceae): A comprehensive overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109(2019), 1670-1679.
- Niazian, M. 2019. Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*, 249(4), 953-973.
- Nicasio-Torres, M.P., Meckes-Fischer, M., Aguilar-Santamaría, L., Garduño-Ramírez, M.L., Chávez-Ávila, V.M., Cruz-Sosa, F. 2012. Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta physiologiae plantarum*, 34(1): 307-316.
- Pérez-González, M.Z., Gutiérrez-Rebolledo G.A., Yépez-Mulia, L., Rojas-Tome I.S., Luna-Herrera, J., Jiménez-Arellanes M.A. 2017. Antiprotozoal, Antimycobacterial, and Anti-Inflammatory Evaluation of *Cnidoscolus Chayamansa* (Mc Vaugh) Extract and the Isolated Compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89: 89-97.
- Pérez-González, M.Z., Macías-Rubalcava, M.L., Hernández-Ortega, S., Siordia-Reyes, A.G., Jiménez-Arellanes, M.A. 2019. Additional compounds and the

- therapeutic potential of *Cnidoscopus chayamansa* (McVaugh) against hepatotoxicity induced by antitubercular drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 117(2019): 1-10.
- Pérez-González, M.Z., Siordia-Reyes, A.G., Damián-Nava, P., Hernández-Ortega, S., Macías-Rubalcava, M.L., Jiménez-Arellanes, M.A. 2018. Hepatoprotective and Anti-Inflammatory Activities of the *Cnidoscopus chayamansa* (Mc Vaugh) Leaf Extract in Chronic Models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018: 1-12
  - Pérez-Hernández, J., González-Cortazar, M., Marquina, S., Herrera-Ruiz, M. Meckes-Fischer, M., Tortoriello, J. Cruz-Sosa, F., Nicasio-Torres, M.P. 2014. Sphaeralcic Acid and Tomentin, Anti-Inflammatory Compounds Produced in Cell Suspension Cultures of *Sphaeralcea Angustifolia*. *Planta Medica* 80(2-3): 209-14.
  - Phillips, G.C.,Garda, M. 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(3): 242-257.
  - Priyadarshan, P.M. 2019. Tissue Culture. In *Plant breeding: Classical to Modern* (pp. 475-491). Springer, Singapore.
  - Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., Osbourn, A. 2014. Triterpene biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65: 225-257.
  - Vanisree, M., Tsay H.S. 2007. Plant cell cultures: Production of Biologically important Secondary Metabolites from Medicinal plants of Taiwan. 12(1): 267-285
  - Venkatachalapathi, S., Subban, R.A.V.I. 2012. Isolation and quantification of lupeol in *Strobilanthes ciliatus* Nees by HPTLC method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(4): 405-08.
  - Wan, W.O., Che, N.A.T., Lau, S.F., Mohamed, S. 2019. Epicatechin and scopoletin rich *Morinda citrifolia* (Noni) leaf extract supplementation, mitigated Osteoarthritis via anti-inflammatory, anti-oxidative, and anti-protease pathways. *Journal of food biochemistry*, 43(3): 1-12.



En este capítulo se describe la actividad antioxidante *in vitro*, la actividad antibacteriana, la actividad antiinflamatoria en dos modelos agudos (tópico y sistémico), y finalmente la actividad antiinflamatoria crónica (tópica) del extracto ANB en modelos *in vivo*.

## Capítulo III

Actividad antioxidante, antibacteriana y antiinflamatoria aguda y crónica.



## 1. Antecedentes

En este capítulo se describen las actividades biológicas evaluadas para el extracto ANB, como: actividad antioxidante *in vitro*, esta se evaluó por el método colorimétrico de reducción del radical DPPH utilizando como control quercetina; la segunda actividad fue la antibacteriana, realizada con el método Kirby-Bahuer midiendo el halo de inhibición; la tercera actividad fue la antiinflamatoria: para esto se utilizaron dos modelos agudos, uno tópico y otro sistémico en ratones Balb/C, como fármaco de referencia se utilizó indometacina. Finalmente, la actividad antiinflamatoria crónica se realizó en un modelo tópico, la inflamación fue inducida con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) el cual se administró cada tercer día por diez días en ratones de la cepa Balb/C.

### 1.1. Inflamación

La mayoría de las enfermedades crónico-degenerativas (como la artritis reumatoide) son iniciadas principalmente por un proceso inflamatorio crónico. Esta respuesta inflamatoria surge en tres fases cronológicas precisas, dependiendo de la patogenicidad y persistencia del estímulo, cada fase parece ser mediada por mecanismos diferentes:

- 1) Fase **aguda** que se caracteriza por vasodilatación local transitoria y mayor permeabilidad capilar
- 2) Fase **subaguda** tardía caracterizada por la infiltración de leucocitos y células fagocíticas
- 3) Fase proliferativa **crónica** en donde hay degeneración y fibrosis del tejido afectado, así como infiltración de linfocitos T y B (Burke *et al.*, 2007).

### 1.2. Procesos inflamatorios y su relación con diversas enfermedades.

La inflamación es una respuesta fisiológica del huésped ante un estímulo físico (golpes, quemaduras, congelación, radiaciones, etc.), químico (abrasiones por ácidos, álcalis, aceite mineral, etc.) y biológico (infección por virus, bacterias o parásitos, toxinas, etc.), por lo que la capacidad de desencadenar un proceso inflamatorio resulta esencial para la supervivencia. El proceso inflamatorio en la fase aguda se caracteriza por vasodilatación, edema y

acumulación de leucocitos en la zona afectada (Alessandri *et al.*, 2013) y cuando no se controla inmediatamente se observa acumulación de prostaglandinas, tromboxanos y otros mediadores químicos en el sitio del daño.

Es bien conocido que los Radicales Libres (RL) principalmente especies reactivas de Oxígeno (ROS) juegan un papel importante para mantener y/o generar procesos inflamatorios como cáncer, arterosclerosis, artritis reumatoide, diabetes y enfermedades neurodegenerativas. Además, se ha descrito que los antioxidantes juegan un papel importante para disminuir los niveles de RL o ROS y por ende actúan como agentes antiinflamatorios en diversos procesos inflamatorios de tipo crónico principalmente al inhibir la vía oxidativa o el estallido respiratorio de las células inmunes (Alessandri *et al.*, 2013).

Cada estímulo desencadena un tipo de respuesta característica, que determina la magnitud e intensidad del proceso inflamatorio; cuando este es agudo, la respuesta proinflamatoria inicial está controlada por moléculas inmunoreguladoras como los inhibidores específicos y los receptores solubles de las citocinas. Las principales citocinas antiinflamatorias son el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1 ra), el factor transformador del crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) y las interleucinas 4, 6, 10, 11 y 13. En condiciones fisiológicas, todas estas moléculas sirven como inmunomoduladores y, por lo tanto, limitan el efecto potencialmente dañino de la reacción inflamatoria. Sin embargo, en condiciones patológicas, la respuesta antiinflamatoria endógena puede ser insuficiente para contrarrestar la actividad inflamatoria. Todo lo anterior da origen a la inflamación crónica (Burke *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2005; Rang *et al.*, 2004). La intensidad de la respuesta inflamatoria es crucial: si esta es insuficiente puede conducir a la inmunodeficiencia, lo que da lugar a las infecciones y cáncer. Por otro lado, un exceso de respuesta causa morbilidad y mortalidad que acompañan a las enfermedades con un importante componente inflamatorio, como la artritis reumatoide (AR), asma, arterosclerosis, esclerosis múltiple, isquemia cerebral y del corazón, enfermedades de Crohn y Alzheimer. En algunos casos, la respuesta inflamatoria alcanza la circulación sistémica, como en la sepsis, meningitis y muchos otros traumas (Lansky *et al.*, 2007), en estos casos, la inflamación puede ser mucho más dañina para el organismo que el estímulo original.

### 1.3. Inflamación crónica

Es una reacción lenta y latente que continúa durante meses e incluso años y supone la destrucción tisular, así como la proliferación local de las células y del tejido conjuntivo. Puede desarrollarse por diferentes causas, como: a) progresión no autorregulable de una inflamación aguda, b) episodios recurrentes de inflamación aguda por agentes infecciosos recurrentes o de alta virulencia, c) inflamación crónica *in vivo*. Se caracteriza por la presencia constante de linfocitos, monocitos y células plasmáticas, debido a que el estímulo nocivo ha sido persistente. La presencia de estas células inflamatorias puede dar lugar a alteraciones funcionales del tejido, ya sea por la acción directa de los mediadores producidos por las células linfoides o bien por el depósito continuo de colágeno por los fibroblastos debido a la cicatrización. En la actualidad van en aumento los padecimientos crónico-degenerativos por diversos factores tanto sociales, ambientales y estilo de vida ya que estos multi-factores desencadenan distintas enfermedades como las cardiovasculares, cáncer, diabetes mellitus, enfermedad renal crónica, enfermedad del hígado graso no alcohólico y trastornos autoinmunes y neurodegenerativos; debido a esto, se necesitan terapias y alternativas para tratar estos padecimientos además de los tratamientos alopáticos convencionales poco efectivos (Furman *et al.*, 2019).

### 1.4. Terapias antiinflamatorias

Dado que las enfermedades de tipo inflamatorio son muy variadas y diversas, la industria farmacéutica ha creado numerosos medicamentos que disminuyen y/o curan los procesos inflamatorios y los cuatro tipos más importantes de agentes farmacológicos que inhiben la respuesta inflamatoria son:

1. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), cuyo prototipo es la aspirina (Rang *et al.*, 2004; Burke *et al.*, 2007). Algunos ejemplos son indometacina, naproxeno, diclofenaco y piroxicam.
2. Fármacos antiinflamatorios esteroideos (AIE), o corticoesteroides, cuyo prototipo es la hidrocortisona. Otros fármacos esteroideos son los glucocorticoides.
3. Los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad o FARME son fármacos de acción lenta, aunque más o menos duradera, evitan la progresión del daño

estructural y, eventualmente, inducen la remisión o curación de la enfermedad. Los FARME se usan principalmente para tratar la artritis reumatoide (AR), como el metrotexato y los aurotimolatos o sales de oro (Bermas, 2014).

4. Agentes biológicos modificadores de la respuesta biológica (MRB), los cuales se unen e inhiben directamente a las citocinas y quimiocinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-1 y IL-6). Algunos ejemplos son el infliximab y el adalimumab (Shah *et al.*, 2014)

Los AINES (aspirina, indometacina, ketorolaco, ibuprofeno), son los medicamentos más recetados a nivel mundial, ya que tienen una eficacia terapéutica similar. Son inhibidores de la ciclooxigenasa inducida (COX-2) y bloquean la producción de prostaglandinas (PG) E2 que actúan como factores inmediatos de la inflamación en su fase aguda y son los responsables del dolor, la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular y la fiebre. Los AINES en concentraciones altas, también aminoran la producción del radical superóxido, inducen la apoptosis, inhiben la expresión de moléculas de adherencia, y disminuyen la cantidad de citosinas proinflamatorias (como TNF- $\alpha$ , IL-1); además modifican la actividad de linfocitos y alteran otras funciones de la membrana celular (Burke *et al.*, 2007).

Los glucocorticoides previenen la inflamación a través de la apoptosis de las células inmunes, un tipo de muerte celular programada. Existen dos tipos, los no fluorados como la prednisona y la prednisolona, los cuales se usan para controlar la inflamación en padecimientos crónicos como la AR, y los fluorados como la dexametasona y la betametasona (Sorrells y Spolsky, 2007; Bermas, 2014).

Otros antiinflamatorios más específicos y menos utilizados por su elevado costo son los modificadores de la enfermedad conocidos como FARME o DMARD; su característica principal es que reducen la sintomatología y esto aumenta la calidad de vida. Algunos ejemplos de estos son el metotrexato (MTX), sulfasalazina y leflunomida, existen otros más específicos como los inhibidores del factor de necrosis (TNF) (adalimumab, certolizumab, pegol, etanercept, golimumab e infliximab), los inhibidores específicos de anti-células T (abatecept) y otros de anti-células b (rituximab) los inhibidores de IL-6 (anticuerpos monoclonales) (Smolen *et al.*, 2013).

Un último tipo de medicamentos para tratar procesos inflamatorios crónicos principalmente como la AR, osteoartritis, son los agentes biológicos modificadores de la respuesta biológica (MRB), los cuales son inhibidores de TNF $\alpha$ , IL-1, como etanercept, infliximab, abatacep, rituximab. Estos agentes biológicos atacan a los componentes específicos de la respuesta del sistema inmunológico que contribuyen a la enfermedad mientras que preservan las funciones inmunológicas necesarias dejándolas intactas (Oray, *et al.*, 2016).

### **1.5. Efectos adversos**

La reacción adversa más común de los AINEs (con excepción de los COX-2 selectivos y de los *p*-aminofenoles), es que producen erosiones y úlceras gástricas (gastropatía por irritación úlcero-gastroduodenal), cuando se consumen frecuentemente (Halter *et al.*, 2001). Los mecanismos por los cuales los AINEs provocan daño en la mucosa gastrointestinal son diversos. La inhibición de la COX-1 provoca un decremento en la secreción de moco, reduce el flujo sanguíneo y causa daño vascular, la acumulación de leucocitos, la disminución en el número de células, factores que contribuyen al daño de la mucosa. Además, debido a la inhibición de la formación de prostaglandinas, existe un aumento de neutrófilos adheridos al endotelio vascular de las vénulas gástricas y mesentéricas, lo cual causa estasis microvascular y daño a la mucosa por isquemia y el incremento de radicales libres y proteasas (Halter *et al.*, 2001). También inducen daño local en el sitio de contacto, al incrementar la permeabilidad gastrointestinal (GI), lo cual a su vez permite que pasen factores agresivos de la luz a la mucosa (Halter *et al.*, 2001). Dado que todos los antiinflamatorios causan en menor o mayor medida efectos adversos, aunado al elevado costo, es necesario contribuir a la búsqueda de este tipo de compuestos en diversas fuentes como las plantas medicinales.

### **1.6. Compuestos obtenidos por proceso biotecnológico con actividad antiinflamatoria.**

Se han descritos distintos metabolitos con actividad antiinflamatoria obtenidos a partir de un proceso biotecnológico, sin embargo, a la fecha no se ha descrito ninguno de la familia de las Euphorbiacea ni del género *Cnidocolus*.

Algunos metabolitos con actividad antiinflamatoria fueron aislados de las siguientes especies: 1) De *Eleutherococcus sessiliflorus* en medio de cultivo MS suplementado con 1

mg/L de 2,4-D en frascos de cultivo con agitación y en oscuridad, lograron obtener eleuterósido y ácido clorogénico, está descrito que el metabolito identificado como eleuterósido tiene actividad antiinflamatoria (Shohael *et al.*, 2008); 2) *Olea europaea* en medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa + 1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/l Kinetina y sustituyeron el K<sup>+</sup> por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en frascos en agitación y en periodo de oscuridad, obtuvieron terpenos como el ácido oleanólico, ácido maslínico, ácido ursólico, ácido pomólico, ácido tomentico y ácido rotundico, estos terpenos tienen reportes de su importante actividad antiinflamatoria (Orihara y Ebizuka 2010); 3) de *Eriobotrya japonica* en medio MS complementado con 2.5 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA y 30 g/L de sucrosa en oscuridad con agitación, obtuvieron distintos terpenos como ácido tomentico, ácido corosólico, ácido ursólico y ácido maslínico (Ho *et al.*, 2010).

Para la especie *S. angustifolia* se han demostrado distintas actividades biológicas, de las cuales destaca su significativa actividad antiinflamatoria en modelos murinos donde del extracto CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH obtenido a partir de cultivos de células en suspensión, se aislaron dos compuestos, tomentina y ácido sphenalico, los cuales mostraron 58% y 66% de actividad antiinflamatoria respectivamente, en el modelo de carragenina a una dosis de 45 mg/kg, administrado por vía intraperitoneal; además en el modelo de actividad antiinflamatoria tópica (TPA) la tomentina (225 mM /oreja) mostró un 57% de inhibición sobre la formación del edema auricular y el ácido sphenalico (174 mM/oreja) mostró un 86% de inhibición, ambos compuestos mostraron un efecto dosis dependiente con una DE<sub>50</sub>= 93 mM. El ácido sphenalico es el compuesto más activo en ambos modelos, tanto tópico como sistémico (Pérez-Hernández, *et al.*, 2013).

En la actualidad se están buscando alternativas dentro de las plantas medicinales como fuente de principios bioactivos, los cuales puedan coadyuvar en el tratamiento convencional de enfermedades crónico-degenerativas como la AR y en enfermedades recurrentes como la tuberculosis (Tb), ya que la mayoría de tratamientos son prolongados y los medicamentos alopáticos tienen elevado costo, son prolongados y generan diversos efectos adversos, esto inciden en el abandono del mismo y/o en complicaciones. Dentro de los efectos adversos de estas terapias se encuentran la hepatotoxicidad, gastrotoxicidad inmunosupresión y

nefrotoxicidad (Halter *et al.*, 2001). Debido a lo anterior se han realizado en los últimos años escalamientos en los procesos inherentes a la síntesis de MtS aislados de plantas medicinales los cuales han llegado a estudios de fase clínica (Nicasio-Torres *et al.*, 2012).

Un estudio que trascendió a la fase clínica es el del extracto de *S. angustifolia* probado en modelos murinos con el modelo de inflamación crónica inducida con Adyuvante completo de Freund (Poliartritis), administrando el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de las partes aéreas de la planta en ratas macho Sprague Dawley a una dosis de 100 mg / kg diarios durante 8 días, mostrando un efecto sostenido sobre la disminución del edema con 62.6% de actividad antiinflamatoria. También existen reportes de la actividad antiinflamatoria en modelos tópicos (TPA) el cual fue realizado en ratones machos (Balb/c) administrados a una dosis de 2 mg/oreja mostrando un 50.65% de inhibición de formación de edema auricular y una significativa protección contra la irritación causada por el TPA (García-Rodríguez *et al.*, 2012). Debido a su alto potencial antiinflamatorio de esta especie se realizó un estudio en fase clínica doble-ciego; el experimento se llevó a cabo en 130 pacientes diagnosticados con osteoartritis, del total de pacientes, 55 fueron tratados con un gel que contenía extracto estandarizado de *S. angustifolia* al 1% (enriquecido con hidroxí-cumarinas) mientras que 58 pacientes fueron tratados con diclofenaco al 2%. La efectividad terapéutica del gel administrado vía tópica por 4 semanas fue de 89% mientras que la del grupo control (diclofenaco al 2%) fue de 91.3%, lo que destaca del estudio es que los pacientes que recibieron el tratamiento (gel del extracto estandarizado) no mostraron efectos adversos, pero si una mejoría de su padecimiento (Romero-Cerecero *et al.*, 2013).

Lo anterior nos lleva a la búsqueda de alternativas para la mejora de padecimientos crónicos degenerativos por lo que los cultivos de tejidos vegetales representan una alternativa a las plantas completas (silvestres) como fuente de fitoquímicos. Este enfoque permite tierras agrícolas que pueden usarse para producir alimentos y otras materias primas, favoreciendo así la producción fitoquímica estandarizada independientemente de las adversidades climáticas y los eventos políticos.

En los últimos 20 años, se han desarrollado diferentes estrategias para aumentar la síntesis y la extracción de metabolitos secundarios del cultivo de tejidos obteniendo resultados notables

(Nielsen *et al.*, 2019), por lo que en este capítulo se presentan los resultados de los ensayos biológicos realizados con el extracto ANB en modelos *in vivo* de inflamación para corroborar si el efecto farmacológico permanece, es similar o aumenta respecto a lo mostrado por el extracto de la planta silvestre.

## 2. Objetivos particulares

- Se evaluó el potencial antioxidante del extracto ANB
- Se evaluó la actividad antibacteriana por el método Kirby-Bauer
- Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto ANB en dos modelos *in vivo* de inflamación aguda.
  - Tópico inducido con TPA
  - Sistémico inducido con carragenina
- Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto ANB en un modelo *in vivo* de inflamación crónica tópica inducida por TPA en múltiple administración.

## 3. Metodología

### 3.1. Potencial antioxidante, iinhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

La capacidad de captura de los radicales libres del DPPH (Sigma–Aldrich, D9132-5G) fue determinada de acuerdo al método colorimétrico de Brand-Williams modificado por Miliauskas (Miliauskas *et al.*, 2004). El DPPH tiene una absorción máxima de 517 nm, la cual disminuye cuando existe una reducción del radical libre por parte de un agente antioxidante.

La absorbancia se midió a los 30 min de reacción en un espectrofotómetro (Bio-Rad Modelo: SmartSpec Plus). El DPPH (1.78 mg) se disolvió en 50 mL MeOH (concentración de  $9 \times 10^{-5}$  M) con una concentración inicial de 35.48  $\mu\text{g/mL}$ , se preparó al momento, a temperatura ambiente y protegido de la luz. El método consistió en mezclar 2.9 mL de la solución de DPPH con 100  $\mu\text{L}$  del extracto ANB previamente disuelto en MeOH a diferentes concentraciones (4 a 132  $\mu\text{g/mL}$ ) en una celda de cuarzo. La mezcla se dejó reaccionar 60 min a 37 °C y se procedió a medir su absorbancia, la cual corresponde a la lectura de la muestra. El blanco fue calibrado con 3 mL de MeOH y el control fueron 100  $\mu\text{L}$  de MeOH y 2.9 mL de la solución con DPPH y se registró su absorbancia 30 min después de mezclarlos



reportando la absorbancia del control. El experimento se realizó por duplicado. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a Pérez-González *et al.*, 2017.

### 3.2. Actividad antibacteriana

Los microorganismos utilizados para el estudio fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 23,235; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Bacillus cereus* ATCC 10,876; *Listeria monocytogenes* ATCC 19,112; *Staphylococcus coagulasa* ATCC 93,410; *Candida albicans* ATCC 10,231; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39,324; *Escherichia coli* ATCC 4157 m y *Salmonella typhimurium* ATCC 14,028. La determinación de la actividad antibacteriana se realizó con el método de difusión en disco (Bauer *et al.*, 1966). Los microorganismos fueron incubados a 37° C en 10 ml de caldo Mueller-Hinton Broth por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo las cepas se ajustaron por turbidimetría comparando con el nefelómetro de McFarland no. 0.5. El extracto ANB disuelto en MeOH fue preparado a tres concentraciones (1000, 500 y 250 µg/mL), posteriormente 10 µL del extracto fue colocado en cada disco de papel filtro (diámetro de 6 mm, Whatman no. 4) estériles, se dejó transcurrir dos horas para asegurar la completa evaporación del MeOH. Una vez secos fueron colocados en cajas con agar Muller Hinton y después las cajas Petri fueron inoculados previamente con 10 µL de cada microorganismo. Los controles positivos utilizados para esta determinación fueron Gentamicina (GE, 10 µg), Oxitetraciclina (TE, 10 µg) y Trimetoprima- Sulfametoxazol (SXT, 25 µg). Las cajas se incubaron a 37 ° C por 24 horas. Posterior al periodo de incubación, se midió la zona de inhibición (halo) y estos fueron representados como (+) activo con halo de 10 mm, (+/-) moderada actividad con halo de 5 mm y (-) no activo. Las determinaciones se realizaron por duplicado, siguiendo la metodología descrita previamente (Pérez-González *et al.*, 2019).

### 3.3. Actividad antiinflamatoria

Esta actividad, se evaluó en ratones machos Balb/C de 20 ±3 g provenientes de Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, los cuales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura controlada de 25 ± 2 °C, con un porcentaje de humedad de 55-80%, con agua y alimento *ad libitum*. El manejo de los animales de experimentación se realizó tomando en cuenta las guías de bioética para la investigación con animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, revisada en agosto del 2015).

### **3.3.1. Inducción del proceso inflamatorio aguda con 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA)**

En este experimento se indujo el edema auricular con la aplicación de 2.5 µg de TPA (Sigma-Aldrich, Lote P8139), siguiendo la metodología descrita por García-Rodríguez *et al.*, 2014; como control positivo se empleó indometacina (Sigma-Aldrich I-7378) aplicada por vía tópica disuelta en acetona. Para este ensayo se formaron cinco grupos de 6 ratones c/u, todos los grupos fueron administrados en la oreja derecha con 50 µL de acetona (vehículo) y en la oreja izquierda se administró 50 µL de el TPA y después de 30 minutos fue administrado el tratamiento dependiendo del grupo como se describe a continuación. Grupo I (control negativo) se le aplicó en una oreja 2.5 µg de TPA disueltos en 25 µL de acetona (vehículo) y en la otra oreja se aplicó únicamente el vehículo (acetona), al grupo II (control positivo) se le aplicó indometacina a dosis de 2 mg/oreja disuelta en 50 µL de acetona, a los grupos III, IV y V (tratados) se les aplicó 50 µL del extracto ANB a dosis de 0.5, 1 y 2 mg/oreja disuelto en acetona. Seis horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente se obtuvo el tejido auricular de ambas orejas realizando cortes de 6 mm de diámetro. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la diferencia del peso entre ambas orejas con respecto al grupo control. La inflamación fue comprobada como el incremento en el peso de la oreja en donde se aplicó el TPA y el porcentaje se calculó respecto a lo reportado por García- Rodríguez *et al.*, 2014.

### **3.3.2. Inducción del proceso inflamatorio aguda con carragenina**

Para este estudio se siguió la metodología descrita por García-Rodríguez *et al.*, 2014 y Olajide *et al.*, 1999; para ello se formaron grupos de 7 ratones seleccionados al azar que fueron administrados de la siguiente forma: Grupo I: control positivo, tratado con indometacina (10 mg/kg) vía oral (v.o): grupos II, III y IV: tratados con el extracto ANB a dosis de 150, 300 y 600 mg/kg por v.o. Estos tratamientos se administraron una hora antes de la carragenina (agente flogístico). Grupo V: control negativo carragenina que recibió vehículo (Tween 80:agua, 1:9) en un volumen de 10 mL/kg v.o una hora antes. A cada grupo se le administró 20 µL de carragenina al 1% disuelto en SSI vía subcutánea (s.c.) en el cojinete plantar.

El edema se registró al medir la inflamación del cojinete plantar con un micrómetro digital (marca Mitutoyo) cada hora. El tiempo cero se considera como la medición del cojinete antes de la aplicación de la carragenina y los tiempos posteriores corresponderán a las 1, 2, 3, 5 y 7 h después de la administración de la carragenina. El porcentaje de inhibición del edema se calculó para cada grupo comparándolo contra el control de vehículo, para esto se siguió la metodología descrita por García-Rodríguez *et al.*, 2014.

### **3.3.3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria crónica: Ensayo de Mieloperoxidasa (MPO)**

Se evaluó la actividad de MPO, para este ensayo se recolectaron muestras de un disco de oído de 6 mm de ratones de la cepa Balb/C que recibieron distintos tratamientos: Grupo I, TPA sin tratamiento; Grupo II, TPA más el fármaco de referencia indometacina (8 mg/kg); Grupo III, TPA más el extracto ANB con la DE<sub>50</sub> obtenida del estudio previo de carragenina (225 mg/mg) por v.o. El TPA fue administrado los días 0, 3, 6, 9 y el día 10 se realizó la obtención de los discos. Cada disco se colocó en un tubo con 1 ml de tampón de fosfato de sodio 80 mM, pH 5,4, con bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0,5% (SigmaAldrich). Las muestras se homogeneizaron durante 30 s a 0 °C en un homogeneizador (micohomogenizador PRO Scientific, modelo PRO-PK-01200S). Los homogeneizados se congelaron y descongelaron tres veces, luego se mantuvo en sonicación durante 20 s. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C durante 10 min. El ensayo MPO se realizó con muestras cuadruplicadas (10 µl cada una), dispensadas en microplacas de 96 pozos con tampón de fosfato de sodio (180 µl, 80 M), pH 5.4 y a 37 °C. Se añadió peróxido de hidrógeno (20 µl, 0,017%). La reacción se inició con la adición de tetrametilbencidina (SigmaAldrich) (20 µl, 18.4 µM) en una dimetilformamida (Sigma-Aldrich). Por otro lado, se registró la ganancia de peso corporal durante todo el estudio cada tercer día (Del-Ángel *et al.*, 2005).

## **4. Resultados y discusión**

### **4.1. Potencial antioxidante**

Los resultados observados para el potencial antioxidante del extracto ANB por el método colorimétrico DPPH se observó que a la concentración máxima (5 mg/mL) evaluada mostró un  $13.33 \pm 0.12\%$  de actividad, mientras que en la concentración mínima (1 mg/mL) el

porcentaje fue de  $1.47 \pm 0.78\%$  (Tabla 3). Al comparar los porcentajes respecto al control positivo (quercetina, 0.15-0.02 mg/mL), se observó que la actividad antioxidante fue escasa en todas las concentraciones probadas para el extracto ANB. Estos datos nos permitieron determinar que la  $CI_{50}$  fue de 16.60 mg/mL mediante una regresión lineal graficando el porcentaje de inhibición vs concentración (ANEXO 1).

Tabla 3 Porcentaje de inhibición del radical DPPH con respecto a la concentración de extracto ANB.

Compuestos	Concentración (mg/mL)	Inhibición (%)	$CI_{50}$ (mg/mL)
Quercetina	0.15	90.89±0.04	0.08±0.12
	0.12	80.78±0.03	
	0.10	65.81±0.07	
	0.07	47.62±0.06	
	0.05	28.48±0.13	
	0.02	11.34±0.07	
Extracto ANB	5.00	13.33±0.12	16.60±0.60
	4.00	12.32±0.22	
	3.00	8.35±0.91	
	2.00	4.30±0.71	
	1.00	1.47±0.78	

Datos presentados como la media ( $\pm$ ) de tres determinaciones (n=3) con su desviación estándar (d.e.); solución stock de DPPH/Metanol a  $9 \times 10^{-5}$  M (35.48  $\mu$ g/mL); el porcentaje de inhibición (%) se calculó la prueba Kruskal-Wallis (ANOVA en Rangos, prueba pos hoc Student Newman Keuls (SNK) ( $p > 0.05$ ))

En estudios previos respecto a la actividad antioxidante de *C. chayamansa* determinado por 3 distintos métodos se ha reportado que DPPH mostró una  $CI_{50} = 25.5 \pm 2.8 \mu$ g/mL, ABTS  $CI_{50} = 38.5 \pm 3.2 \mu$ g/mL and NO  $CI_{50} = 44.3 \pm 2.5 \mu$ g/mL comparada con el estándar que fue catequina ( $1.5 \pm 0.0$ ,  $1.8 \pm 0.0$  y  $4.2 \pm 0.1$ , respectivamente) (Ramos-Gómez *et al.*, 2017), otros autores reportan que por el método de DPPH el extracto MeOH de las hojas de *C. chayamansa* a la concentración de 1000  $\mu$ g/mL presentó un 13.75% de inhibición, empleando como control positivo ácido gálico y trolox (Loarca-Piña *et al.*, 2010). Así mismo, García-Rodríguez *et al.*, 2014 reportó un 10.58% de inhibición para el extracto Hex, 11.68% para el extracto de AcOEt y 10.66% para el EtOH a una concentración de 33  $\mu$ g/mL, empleando ácido gálico como control positivo, donde se reportó también el contenido de fenoles totales fue de 22.35, 13.23 y 35.70 mEQAG/g de extracto para cada extracto. Al comparar los

resultados previamente reportados con los descritos en el presente trabajo, encontramos que el extracto ANB tiene escasa potencial antioxidante.

#### 4.2. Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del extracto fue determinada por el método de Kirby-Bauer (1966) y se encontró que a la concentración de 1 mg/disco fue activa contra *S. aureus* (ATCC 23,235) *S. coagulasa* (ATCC 93, 410) y *C. albicans* (ATCC 10,231) con un halo de inhibición de 10 mm, por otro lado, para *K. rhizophila*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. tiphymurium* no fue activo a la máxima concentración probada (1 mg/disco) (Tabla 4).

Tabla 4 Valores de la actividad antimicrobiana (método de Kirby-Bauer) del extracto ANB

Tratamientos	<i>S. aureus</i>	<i>K. rhizophila</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. coagulasa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. tiphymurium</i>
Control	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1 mg/ml	+	–	–	–	+	+	–	–	–
0.5mg/ml	–	–	–	–	–	–	–	–	–
0.25 mg/ml	–	–	–	–	–	–	–	–	–
SXT	12 mm	10 mm	15 mm	–	11 mm	5 mm	12 mm	11 mm	–
GE	6 mm	10 mm	11 mm	7 mm	6 mm	8 mm	7 mm	6 mm	7 mm
TE	10 mm	11 mm	9 mm	2 mm	11 mm	9 mm	–	–	–

Los datos se representan como: (+) activo con halo de 10 mm, (+/-) moderada actividad con halo de 5 mm y (–) no activo, sin halo ANB extracto; GE = Gentamicina (10 µg), TE = Oxitetraciclina (30 µg) y SXT = Trimetoprim-Sulfametoxazol (15 µg).

Reportes recientes muestran que el extracto CHCl<sub>3</sub>:MeOH de las partes aéreas de *C. chayamansa* presento escasa actividad antibacteriana contra dos cepas, *E. coli* (ATCC 4157) y *P. aeruginosa* (ATCC 39324) a la concentración de 1 mg/disco dando una inhibición de 2 mm (Pérez-González *et al.*, 2017). A la fecha no existen reportes adicionales sobre la actividad antibacteriana de *C. chayamansa* sin embargo si se reporta esta actividad en otra especie; por ejemplo, el extracto EtOH de las hojas de *C. aconitifolius* resulto inactivo contra las cepas *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosas*, *B. sereus*, *Klebsiella spp* y *C. albicans* la máxima concentración evaluada 500 mg/mL (Senjobi *et al.*, 2011). Por otro lado, al evaluar el extracto EtOH de raíz, hojas y tallos de *C. aconitifolius* a una concentración de 20 mg/mL, se obtuvo que el extracto EtOH de la raíz fue activo contra *Proteus spp* (15 mm), *B. subtilis* (32 mm) y *E. coli* (24 mm), mientras que el extracto EtOH de las hojas fue activo contra *K. oxytoxa* (12

mm), *B. subtilis* (14.5 mm) y *E. coli* (12 mm); finalmente el extracto EtOH de los tallos fue activo contra *K. oxytoca* (12 mm), *B. subtilis* (21 mm), *E. coli* (23 mm) y *P. aeruginosa* (14.5 mm) (Aldeniran *et al.*, 2013). En conclusión y tomando en cuenta lo previamente reportado, se puede mencionar que el extracto ANB mostró una moderada actividad antimicrobiana a concentraciones de 1 mg/mL, comparado por lo reportado para la planta silvestre. Sin embargo, no es de amplio espectro debido a que de las nueve cepas probadas solo inhibió a tres, lo que nos permite suponer que esta especie vegetal no es candidato para la obtención de compuestos antibacterianos. Cabe mencionar que, en la medicina tradicional, la especie es usada para lavados vaginales, y en el presente trabajo se encontró que esta especie fue activa contra *C. albicans*, por lo que se corroboró uno de los usos medicinales (empleado para lavados vaginales). Por otro lado, se sabe que *C. albicans* es un patógeno oportunista muy fuerte en pacientes inmunodeprimidos y les provoca candidiasis. Entre los pacientes inmunodeprimidos se encuentran pacientes con quimioterapia, terapia con antibióticos, pacientes con corticosteroides inhalados tópicos o sistémicos crónicos, diabetes mellitus, insuficiencia suprarrenal y edad avanzada (Robertson y Mehta, 2019).

### 4.3. Actividad antiinflamatoria

#### 4.3.1. Actividad antiinflamatoria aguda sistémica inducida con carragenina

En este modelo se generó el cuadro edematoso agudo sistémico al administrar 25  $\mu$ L de carragenina al 2% en la región sub-plantar, el grupo control mostró un máximo de la formación del edema en la quinta hora posterior a la inoculación ( $1.007 \pm 0.045$  mm), el grupo tratado con el fármaco de referencia (indometacina, 10 mg/kg) presentó un efecto antiinflamatorio máximo (52.05%) a la quinta hora con respecto al control.

Los animales tratados con el extracto ANB a dosis de 75 mg/kg, administrados por vía i.g. presentaron un máximo de inhibición (28.21%) a la 5h, este porcentaje de inhibición fue menor a la indometacina y a las otras dos dosis probadas (150 y 300 mg/kg) en la misma hora. Al administrar el extracto de ANB a la dosis de 150 y 300 mg/kg se observó mayor porcentaje de inhibición fue similar a la 3h, siendo de 42.96 y 42.12 % respectivamente. Por otro lado, el porcentaje máximo presentado fue a la 5h a la dosis de 300 mg/kg se observó un 55.09% de inhibición, siendo este valor mayor que el presentado por el fármaco de referencia (indometacina) a la misma hora (52.05%) (Tabla 5).

Tabla 5 Actividad antiinflamatoria del extracto ANB sobre el edema subplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/C machos.

Tiempo de formación de edema (h)	Formación de edema subplantar (mm) y porcentaje de inhibición (%)				
	Control carragenina	Indometacina (10 mg/kg)	ANB (75 mg/kg)	ANB (150 mg/kg)	ANB (300 mg/kg)
1	0.2508±0.010 <sup>•cd</sup>	0.240±0.01 (4.20%)	0.222±0.021 (11.40%)	0.195±0.019 (22.08%)	0.202±0.011 (19.29%)
3	0.568±0.014 <sup>•▲cd</sup>	0.437±0.025 <sup>••cd</sup> (23.02%)	0.424±0.023 <sup>••acd</sup> (25.40%)	0.324±0.014 <sup>••ab</sup> (42.96%)	0.0328±0.018 <sup>••ab</sup> (42.18%)
5	1.007±0.045 <sup>•▲bcd</sup>	0.483±0.006 <sup>•▲ac</sup> (52.05%)	0.723±0.028 <sup>•▲abcd</sup> (28.21%)	0.607±0.022 <sup>•▲abd</sup> (39.68%)	0.452±0.006 <sup>•▲ac</sup> (55.09%)

Cada grupo está representado como la media (±) y su error estándar (e.e.). La administración de los tratamientos fue por vía intragástrica (i.g). Los valores en paréntesis indican el porcentaje de inhibición del edema con respecto del grupo control. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); a vs Control carragenina; b vs Indometacina; c vs ANB 150 mg/kg; d vs ANB 300 mg/kg; • vs 1h; ▲ vs 3h; ◆ vs 5h; ANB, extracto de células en suspensión *Cnidocolus chayamansa*; n=6.

García-Rodríguez *et al.*, 2014 reportaron la actividad antiinflamatoria para los extractos AcOEt y EtOH obtenidos de la planta silvestre y administrados por vía intraperitoneal en el modelo de carragenina a la dosis de 500 mg/kg. Encontraron que el extracto de AcOEt fue el más activo, el cual presentó un porcentaje de inhibición de 28.78 y de 30.29 a la 3 y 5h, respectivamente. En otro trabajo se describe la actividad antiinflamatoria del extracto CHCl<sub>3</sub>:MeOH de *C. chayamansa* a las dosis de 150, 300 y 600 mg/kg, en este caso mostraron 5.57 32.43 y 12.11% de inhibición a la 5h, también reportaron la actividad antiinflamatoria de los compuesto puros aislados del extracto, siendo el 5-hidroxi-7,30,40-trimetoxiflavanona el más activo con 89.33% de inhibición a la 5h y a la dosis de 25 mg/kg, seguido por el caempferol-3,7-dimetil éter con un 78.30% de inhibición de la inflamación a la misma dosis (25 mg/kg) (Pérez-González *et al.*, 2017).

Comparando los resultados por los obtenidos en el extracto ANB el efecto antiinflamatorio es mayor a la dosis de 300 mg/kg (55.09%) que los ya reportados (Figura 19). Cabe mencionar que deducimos que los compuestos presentes en el extracto ANB pueden contener compuestos que estén en concomitancia o adición por lo que el efecto de extracto ANB se potencialice mostrando importante actividad antiinflamatoria, sin embargo, es importante realizar un fraccionamiento y aislamiento de los compuestos mayoritarios para poder conocer la actividad antiinflamatoria de los metabolitos secundarios puros.

Se sabe que el fármaco de referencia (indometacina) es el fármaco mayormente empleado para tratar procesos inflamatorios agudos y/o crónicos; sin embargo, provoca diversos efectos adversos como úlceras e intolerancia gastrointestinales debido a que no es específico de inhibir la COX-2, bloquea la agregación plaquetaria (inhibición de la síntesis de tromboxano), inhibición de la mortalidad gestacional (propagación de la gestación), inhibición de la función renal mediada por prostaglandinas, daño hepático y reacciones de hipersensibilidad a otros fármacos, por lo que actualmente se busca la disminución de estos efectos adversos dando pie a buscar alternativas, una de ellas es el uso de las plantas medicinales como terapia alterna o búsqueda de nuevos compuestos activos presentes en ellas.



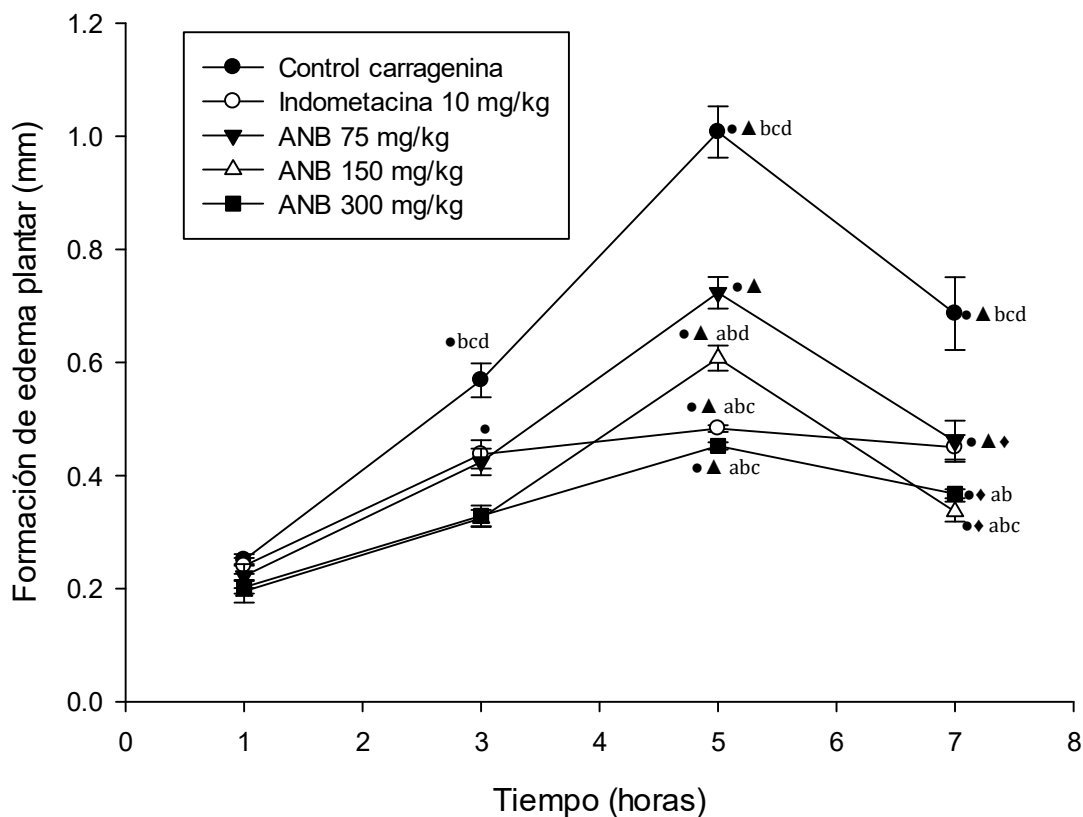


Figura 19 Actividad antiinflamatoria aguda inducida con carragenina. Cada grupo está representado como la media ( $\pm$ ) y su error estándar (e.e.). La administración de los tratamientos fue por vía intragástrica (i.g). Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); a vs Control carragenina; b vs Indometacina; c vs CNI 150 mg/kg; d vs CNI 300 mg/kg; ● vs 1h; ▲ vs 3h; ◆ vs 5h; ANB, extracto de células de suspensión *Cnidoscopus chayamansa*; n=6.

#### 4.3.2. Actividad antiinflamatoria aguda tópica inducida con TPA

Este ensayo se realizó en ratones machos Balb/C y el extracto se evaluó a dosis de 0.5, 1 y 2 mg/oreja, administrado por vía tópica y los resultados que se describen corresponden a los obtenidos a la 6h después de la inoculación del TPA. El grupo control presentó un edema auricular de  $14.61 \pm 0.40$  mg, que corresponde al 100% de inflamación y el grupo con indometacina (fármaco de referencia) presentó una inhibición del 69.74% a la dosis de 2 mg/oreja, respectivamente respecto al control de TPA (Tabla 6). Los grupos tratados con el extracto ANB a dosis 0.5, 1 y 2 mg/oreja mostraron una inhibición de 53.96, 71.56 y 73.30%, respectivamente, estos porcentajes de inhibición fueron mayores a los mostrados por el fármaco de referencia (indometacina) en las dosis de 1 y 2 mg/oreja.

Tabla 6 Actividad antiinflamatoria del extracto ANB sobre el edema auricular tópico inducido con TPA

Tratamiento	Dosis (mg/oreja)	Formación de edema auricular (mg)
Control	---	14.61±0.40
Indometacina	2	4.42±1.60 <sup>•b</sup> (69.74%)
	0.5	6.72±0.87 <sup>*b</sup> (53.96%)
ANB	1	4.15±0.56 <sup>•ab</sup> (71.59%)
	2	3.9±0.81 <sup>*•ab</sup> (73.30%)

Datos presentados como la media ( $\pm$ ) con error estándar (e.e.). Los valores en paréntesis indican el porcentaje de inhibición del edema (%) con respecto al testigo positivo. Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba pos hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); • vs 0.5 mg; \* vs 1 mg; a vs Control; b vs Indometacina; ANB, Extracto de células en suspensión de *Cnidoscopus chayamansa*; n= 6.

A la fecha ya existen trabajos donde reportan la actividad antiinflamatoria de distintos extractos de hojas de *C. chayamansa*, como el Hex, AcOEt y EtOH (obtenido de manera sucesiva) y fueron probados a la dosis de 2 mg/oreja, administrados por vía tópica, encontraron que el porcentaje promedio de inhibición fue de 31 % a la 6h para los tres extractos empleando el mismo modelo de inflamación en ratones machos CD1 (García-Rodríguez *et al.*, 2014). Otro estudio del efecto antiinflamatorio del extracto CHCl<sub>3</sub>:MeOH de las hojas de *C. chayamansa* en ratos de la cepa Balb/C a las dosis de 0.5, 1 y 2 mg/oreja el porcentaje de inhibición fue de 27.62, 37.19 y 55.46% respectivamente pero por otro lado, evaluaron la fracción enriquecida con triterpenos a la dosis de 2 mg/oreja obteniendo un 38.07% de inhibición de la inflamación, y varios compuestos aliados como el moretenol (30.34%), acetato de moretenol (16.65%), eter caempferol-3,7-dimetil (31.84%) y 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxiflavanona (13.47%) (Pérez-González *et al.*, 2017). De acuerdo con los resultados obtenidos podemos mencionar que el porcentaje de inhibición del proceso inflamatorio fue mayor para el extracto ANB obtenido de cultivos de células en suspensión que el mostrado por la planta silvestre previamente descrito (73.30% vs 55.46%) a la dosis de 2 mg/oreja. El porcentaje de inhibición del extracto ANB a la dosis de 1 mg/oreja alcanzó

el 71.59% siendo mayor que el reportado por García-Rodríguez *et al.*, 2014 (31%) y Pérez-González *et al.*, 2017 (37.1%) a la misma dosis. La formación del edema auricular fue similar en las dosis de 1 y 2 mg/ oreja sin embargo estadísticamente no fueron iguales (Figura 20), por lo que podemos concluir que el extracto ANB muestra un efecto dependiente de la dosis y que el cultivo de células en suspensión favorece la producción con metabolitos secundarios con importante actividad antiinflamatorios ya que el porcentaje de inhibición es mayor que el de la planta silvestre.

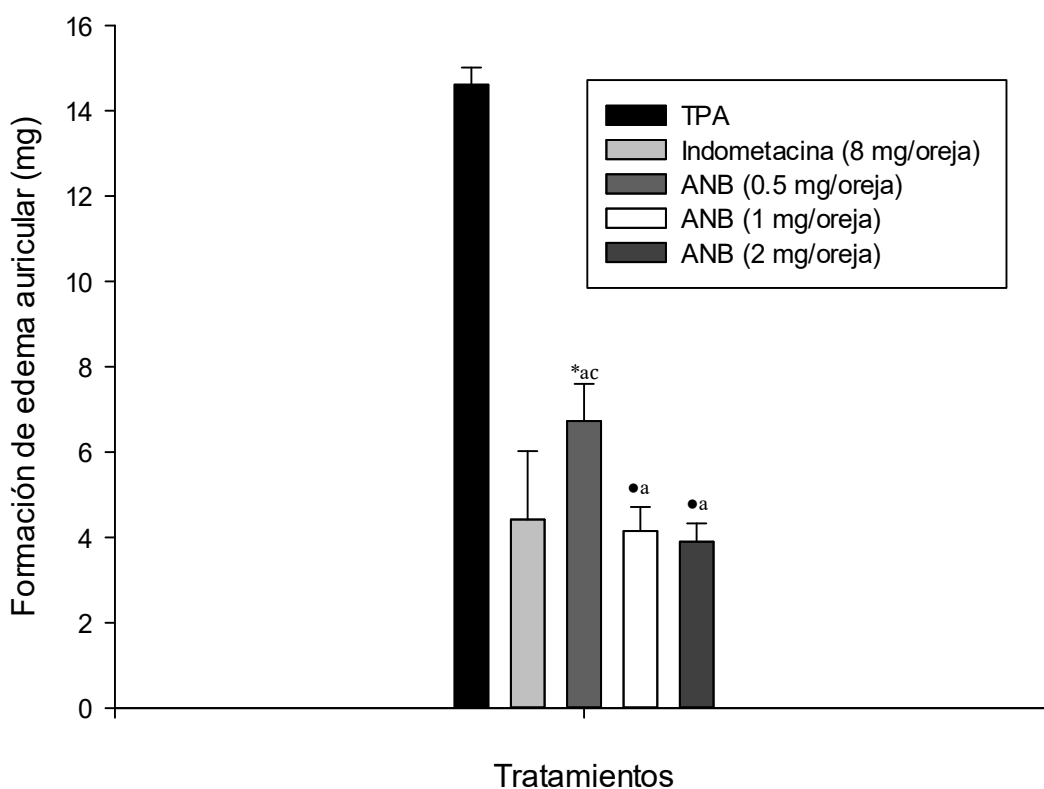


Figura 20 Actividad antiinflamatoria aguda tópica inducida con TPA. Datos presentados como la media ( $\pm$ ) con error estándar (e.e). Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba pos hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ). • vs 0.5 mg; \* vs 1 mg; a vs TPA; b vs Indometacina; c vs ANB (0.5 mg/oreja); c b vs ANB (1 mg/oreja). ANB, Extracto de células en suspensión de *Cnidocolus chayamansa*; n= 6

Es importante mencionar que en este trabajo se calculó la DE<sub>50</sub> para el extracto ANB en ambos modelos de inflamación siendo de 0.48 mg/oreja para el modelo tópico de TPA y de 223.87 mg/kg para el modelo sistémico de carragenina.

### 4.3.3. Actividad antiinflamatoria crónica

En este ensayo se reportó la ganancia de peso corporal en el cual se observó que los ratones del grupo control (TPA), el fármaco de referencia (indometacina 8mg/kg v.o.) y los tratados con el extracto ANB mostraron una pérdida considerable de peso (Figura 21), sin embargo, el tratamiento con TPA y el grupo tratado con el extracto ANB la pérdida de peso es similar; se sabe que la pérdida de peso en modelos de inflamación se debe a que los animales presentan dolor por la movilidad espontanea de la oreja por lo que evitan esfuerzos, uno de ellos es alimentarse y comienzan con la pérdida de peso (Krug *et al.*, 2019). También se observa que la pérdida de peso con el fármaco de referencia (indometacina) es mayor. La indometacina es un AINE no específico de la inhibición de la COX-2 si no también de la COX-1 y se sabe que la inhibición de la COX I provoca úlceras gástricas (Peseban *et al.*, 2020), esto puede desencadenar dolor, causando letargia y falta de apetito en los animales tratados con el fármaco de referencia (indometacina), por consecuencia reducen su peso (Figura 21).

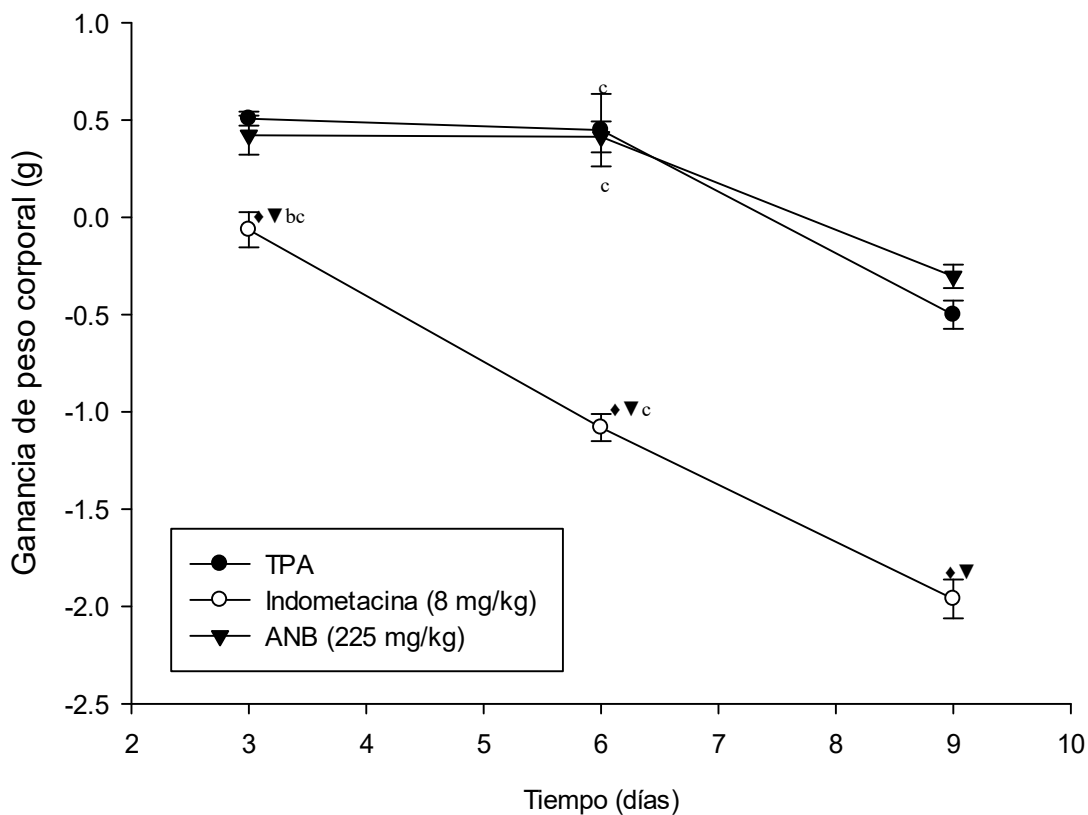


Figura 21 Ganancia de pesos corporal de ratones expuestos al modelo de inflamación crónica por TPA.

Datos presentados como la media ( $\pm$ ) con su error estándar (e.e.). Prueba estadística Análisis de Varianza ANOVA Bifactorial con medidas repetidas (RM), prueba pos hoc Student Newman-Keuls (SNK), ( $p \leq 0.05$ );  $\blacklozenge$  vs TPA;  $\blacktriangledown$  vs extracto; b vs 6 días; c vs 9 días. n=10.

También se realizó el cálculo de porcentaje de inhibición de la inflamación, los siguientes resultados corresponden al día 10 del experimento, mostrando que la indometacina presentó un  $60.63 \pm 2.89$  % de inhibición de la inflamación mientras que el extracto ANB de *C. chayamansa* mostró un  $37.53 \pm 3.43$ % (Figura 22), es considerablemente más bajo comparado con el fármaco de referencia.

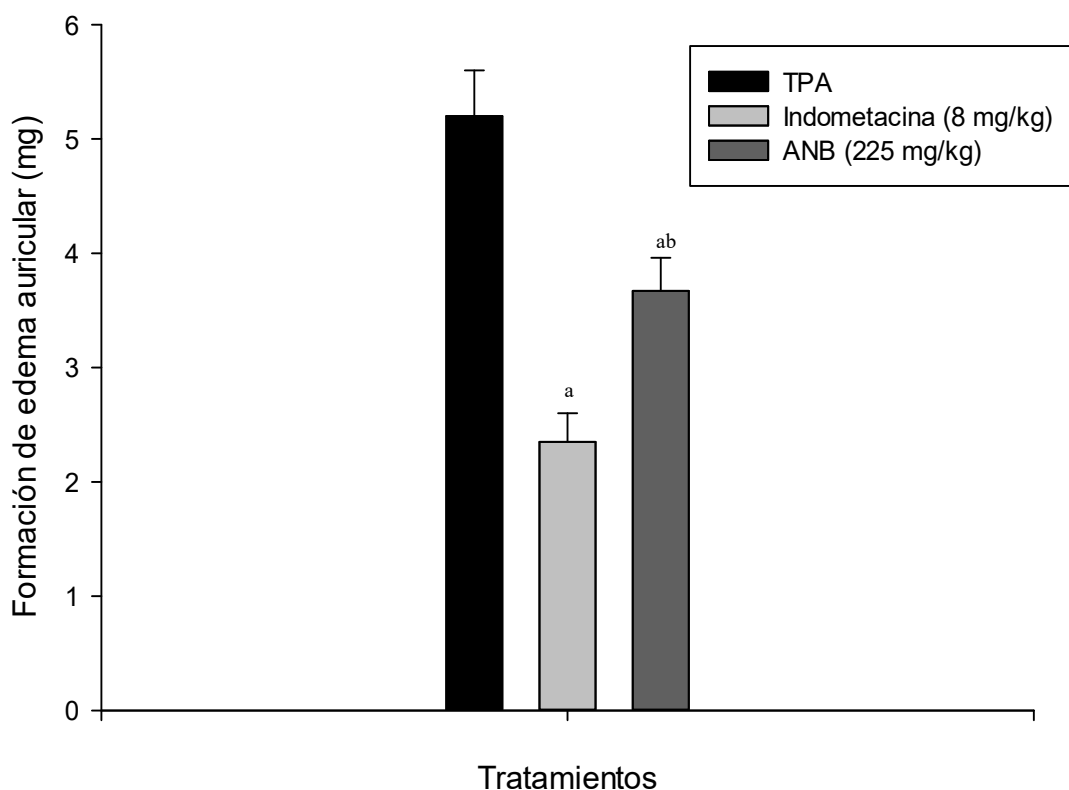


Figura 22 Actividad antiinflamatoria del extracto ANB en el modelo de inflamación crónica TPA. Datos presentados como la media ( $\pm$ ) con error estándar (e.e.). Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba pos hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ). a vs TPA. b vs Indometacina; ANB, Extracto de células en suspensión de *Cnidocolus chayamansa*; n= 6

Actualmente no existen reportes sobre la actividad antiinflamatoria crónica para la especie *C. chayamansa*; empleando el modelo de inflamación crónica inducida por TPA en machos CD1, previamente se han evaluado distintos compuestos semisintéticos aislados de *Ligusticum porteri*, los compuestos fueron dicetodiacido de diligustilida, ciclotokinolida B, demetilwallichilida, cetoácido de tokinolida B y cetoéster de tokinolida B, mostrando un

66.00, 59.00, 48.55, 38.59 y 31.52% de inhibición respectivamente, al día 10 de sacrificio. Comparando el efecto antiinflamatorio que mostró el extracto ANB, el cual fue similar al del cetoéster de tokinolida B (Del Ángel *et al.*, 2015).

En cuanto a la observación macroscópica de las orejas al día diez de nuestro experimento, el grupo control de TPA se observó una elevada infiltración leucocitaria, con pequeñas cicatrices, en relación a la lesión física (acicalamiento frecuente) y se nota una disminución en el tamaño de la oreja. En cuanto al grupo tratado con la indometacina se observó vasodilatación y menor infiltración leucocitaria comprado con el fármaco de referencia. Las orejas de los animales tratados con el extracto ANB mostraron mayor vasodilatación que el grupo tratado con el fármaco de referencia, pero menor que grupo de TPA, por otro lado, la infiltración leucocitaria se observó similar a la mostrada por el grupo con indometacina (Figura 23).

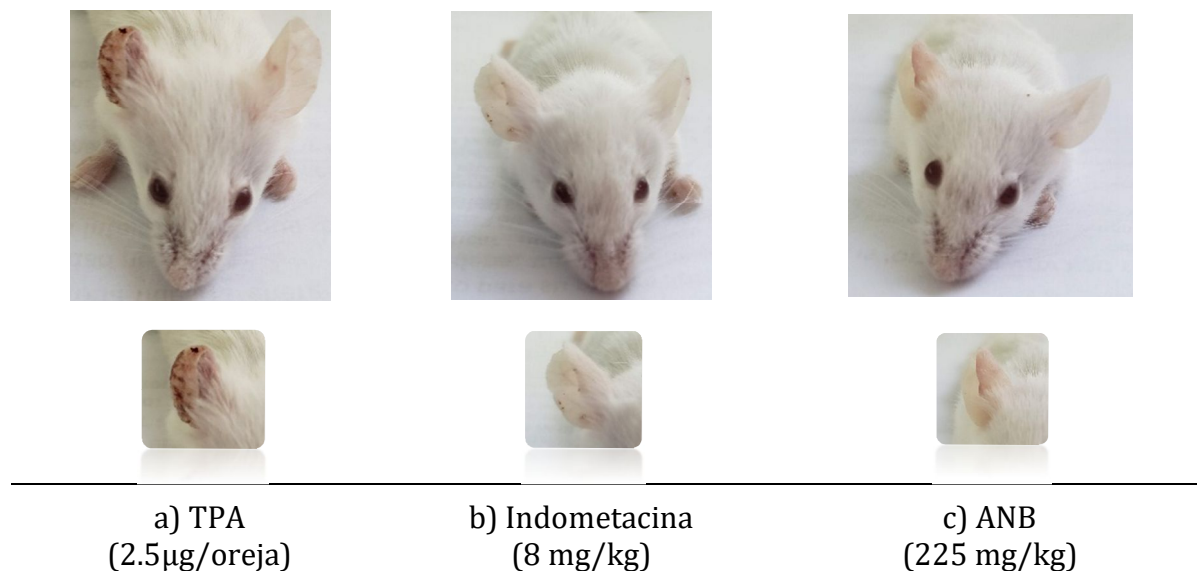


Figura 23 Efecto macroscópico de los tratamientos a los 10 días en las orejas de ratos hembras Balb/C.

La actividad de la MPO es el componente más importante en el proceso inflamatorio. MPO es una enzima almacenada en gránulos azurófilos de neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos, se libera en el líquido extracelular de un proceso inflamatorio (Raj *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos muestran una inhibición de la de la MPO en los grupos tratados con

el fármaco de referencia (Indometacina), esta fue de  $42.02 \pm 0.42\%$ , mientras que en el grupo que recibió el extracto ANB de *C. chayamansa* mostró una inhibición de la MPO de  $34.55 \pm 0.64\%$  (Figura 24). Cabe señalar que a pesar de que el porcentaje de inhibición de la inflamación fue del 37.53%, no está relacionado con la cantidad de inhibición de enzima MPO, esto probablemente se debe que el mecanismo de acción no es solamente por inhibición de MPO sino también por la inhibición de COX. Se sabe que la actividad de la MPO está directamente relacionada con la concentración de neutrófilos en el tejido inflamado, por lo que la cuantificación de la MPO es un buen marcador de la quimiotaxis y de la infiltración de neutrófilos en el proceso inflamatorio (Raj *et al.*, 2020). Es importante resaltar que la inhibición de MPO fue similar entre el extracto y fármaco de referencia.

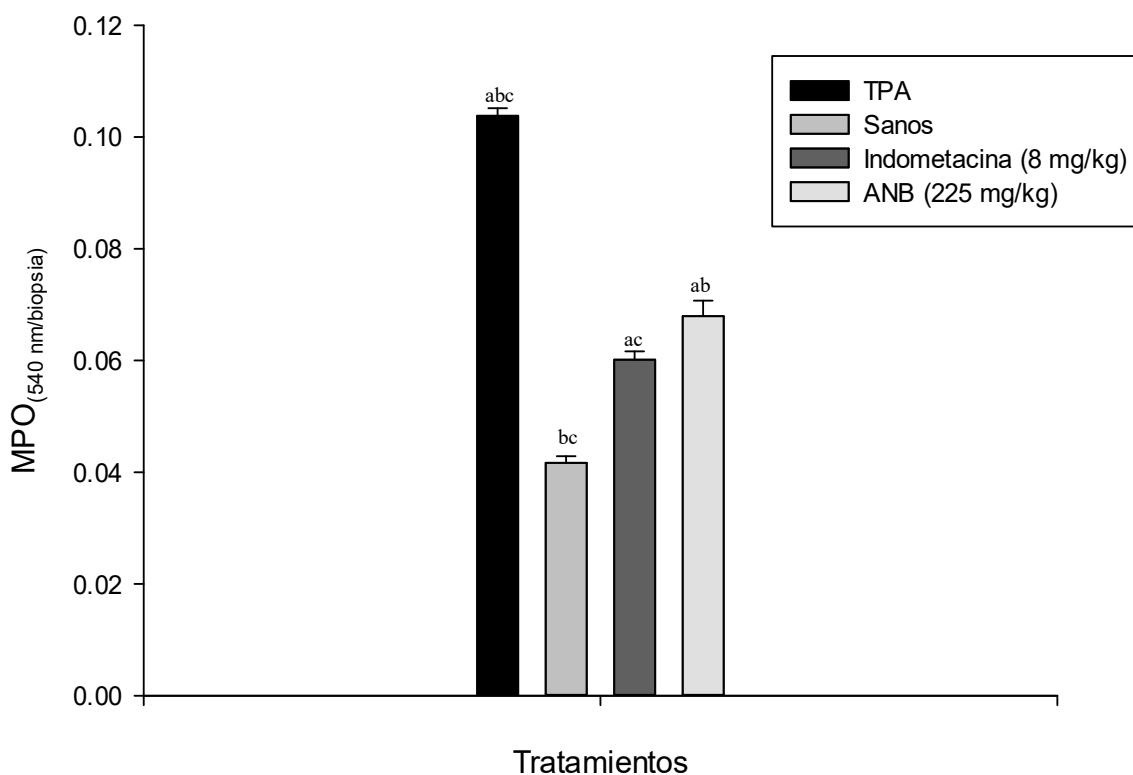


Figura 24 Inhibición de la actividad de la mieloperoxidasa con el extracto ANB obtenido de células en suspensión de *C. chayamansa*. Datos presentados como la media ( $\pm$ ) con error estándar (e.e). Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba pos hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ). a vs Sanos; b vs Indometacina; c vs ANB, n= 6.

Esto sugiere que la presencia de cumarinas, terpenos y compuestos fenólicos en el extracto ANB son los encargados de la actividad antiinflamatoria, sin embargo, el efecto

antiinflamatorio es moderado, por lo que se propone realizar el modelo de TPA crónico con administración tópica para conocer su efecto. Una vez completo el estudio se proponer el posible uso farmacológico del extracto ANB obtenido por biotecnología vegetal para tratar enfermedades inflamatorias.

## 5. Conclusiones

- El extracto ANB mostró actividad antioxidante con una  $CI_{50}$ = 16.60 mg/mL comparada con el de la planta silvestre es menor.
- La actividad antibacterial fue escasa sin embargo fue activo contra tres cepas *S. aureus* (ATCC 23,235) *S. coagulasa* (ATCC 93, 410) y *C. albicans* (ATCC 10,231).
- El extracto del cultivo de células en suspensión mostró una  $DE_{50}$ = 223.87 mg/kg en el modelo de inflamación sistémico, siendo mejor que el ya reportado para la planta silvestre (467.73 mg/kg).
- En el modelo de TPA el efecto antiinflamatorio a la dosis de 2 mg/oreja fue de 73.90% mejor que el de la planta silvestre (21.24 %).
- Las  $DE_{50}$  para el extracto ANB en ambos modelos fueron menores a las reportadas para la planta silvestre.
- En el modelo crónico se observó una disminución de peso corporal en todos los grupos.
- Se observa una disminución de los daños macroscópicos en las ojerías del ratón, como en la coloración rojiza, el tamaño y el grosor del edema.
- La actividad de la mieloperoxidasa fue inhibida en el grupo tratado con el extracto ANB en un 34.55%, este porcentaje es muy cercano al mostrado por el fármaco de referencia.



## Conclusiones generales

Se encontraron las condiciones para obtener explantes asépticos agregando antifúngico y antibióticos, se establecieron las condiciones para la generación de callo con dos reguladores de crecimiento vegetal ANA y BAP, el callo obtenido se utilizó para la realización de cultivo de células en suspensión utilizando como fuente de carbono *D- glucosa*, al día 40 se identificó (HPLC) acetato de lupeol como el metabolito secundario mayoritario (38.1 mg/g de extracto seco). Por otro lado, al día 40 se obtuvo biomasa para la realización del extracto (CHCl<sub>3</sub>:MeOH) con un rendimiento del 19% (22.8 g), también se identificaron otros metabolitos secundarios como: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cinámico, quercetina, escopoletina y  $\alpha$  y  $\beta$  amirina. El extracto mostro escasa actividad antimicrobiana (vs *S. aureus*, *S. coagulasa* y *C. albicans*) y bajo potencial antioxidante (CI<sub>50</sub>= 16.6 mg/mL), en cuanto a la actividad antiinflamatoria para los modelos agudos, en el de carragenina se obtuvo una DE<sub>50</sub> de 223.87 mg/kg, mientras que para el tópico la DE<sub>50</sub> fue 0.48 mg/oreja ambas menores a la del fármaco de referencia indometacina (467.73 mg/kg y 1.66 mg/oreja). En el modelo crónico observamos que extracto ANB mostró un porcentaje de inhibición de inflamación al día 10 administrado por vía intragástrica de 37.53% a la DE<sub>50</sub> (225 mg/kg) obtenida en el modelo agudo. En cuanto a la inhibición de a enzima mieloperoxidasa el extracto ANB mostró una inhibición del 34.45% similar al del fármaco de referencia indometacina (42.02%), también se observo una ligera perdida de peso, sin embargo, el grupo de indometacina mostró una pérdida de peso considerable.

## 6. Referencias.

- Adeniran, O.I., Olajide, O.O., Igwemmar, N.C., Orishadipe, A.T. 2013. Phytochemical constituents, antimicrobial and antioxidant potentials of tree spinach [*Cnidoscolus aconitifolius* (Miller) IM Johnston]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(19): 1310-1316.
- Alessandri, A.L., Sousa, L.P., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Pinho, V., Teixeira, M.M. 2013. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & therapeutics*, 139(2): 189-212.
- Batlouni, M. 2010. Antiinflamatorios no esteroides: efectos cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 94(4), 538-46.
- Bermas, B. L. (2014). Non-steroidal anti-inflammatory drugs, glucocorticoids and disease modifying anti-rheumatic drugs for the management of rheumatoid arthritis before and during pregnancy. *Current opinion in rheumatology*, 26(3): 334-340.
- Burke, A., Smyth, E.M., FitGerald, G.A. 2006. Agentes analgésicos-antipiréticos; farmacoterapia de la gota. *Las bases farmacológicas de la terapéutica* 671-716.
- Del-Ángel, M., Nieto, A., Ramírez-Apan, T., Delgado, G. 2015. Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides. *European journal of pharmacology*, 752: 40-48.
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D.W., Fasano, A., Miller, G. W., Miller, A.H., Mantovani, A., Weyand, C.M., Barzilai, N., Goronzy, J.J., Ronda, T.A., Effros, R.B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., Slavich, G.M. 2019. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature medicine*, 25(12): 1822-1832.
- García-Rodríguez, R.V., Gutiérrez-Rebolledo, G.A. Méndez-Bolaina, E., Sánchez-Medina, A. Maldonado-Saavedra, O., Domínguez-Ortiz M.A., Vázquez-Hernández, M., Muñoz-Muñiz, O.D., Cruz-Sánchez, J.S. 2014. *Cnidoscolus Chayamansa* Mc Vaugh, an Important Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cardioprotective Plant Used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 151(2): 937-43
- Halter, F., Schmassmann, A., Peskar, B.M., Tarnawski, A.S. 2001. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut and international Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 49: 443-543.
- Ho, H. Y., Liang, K. Y., Lin, W. C., Kitanaka, S., Wu, J. B. (2010). Regulation and improvement of triterpene formation in plant cultured cells of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(5): 588-592.
- Hu, F., Hepburn, H.R., Li, Y., Chen, M., Radloff, S.E., Daya, S. 2005. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3): 276-283.
- Krug, H.E., Dorman, C., Blanshan, N., Frizelle, S., Mahowald, M. 2019. Spontaneous and Evoked Measures of Pain in Murine Models of Monoarticular Knee Pain. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(144): 1-6.
- Lansky, E.P., Newman, R.A. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 177-206.

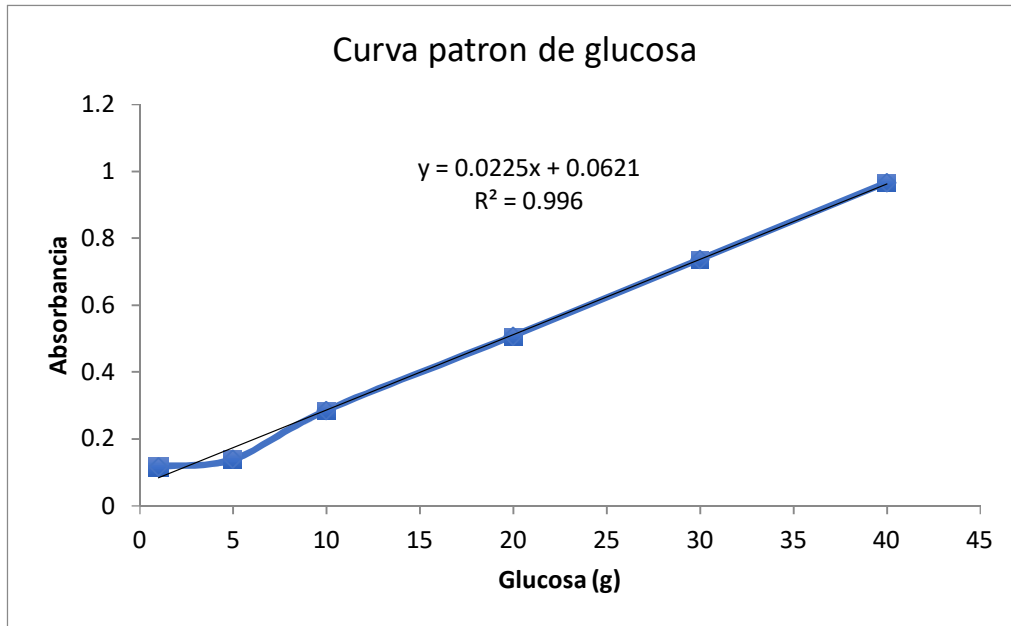
- Loarca-Piña, G., Mendoza, S., Ramos-Gómez, M., Reynoso, R. 2010. Antioxidant, antimutagenic, and antidiabetic activities of edible leaves from *Cnidoscopus chayamansa* Mc. Vaugh. *Journal of Food science*, 75(2), H68-H72.
- Nicasio-Torres, M.P., Meckes-Fischer, M., Aguilar-Santamaría, L., Garduño-Ramírez, M.L., Chávez-Ávila, V.M., Cruz-Sosa, F. 2012. Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta physiologiae plantarum*, 34(1): 307-316.
- Nielsen, E., Temporiti, M.E.E., Cella, R. 2019. Improvement of phytochemical production by plant cells and organ culture and by genetic engineering. *Plant cell reports*, 1-17.
- Oray, M., Abu Samra, K., Ebrahimiadib, N., Meese, H., Foster, C.S. 2016. Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert opinion on drug safety*, 15(4): 457-465.
- Paseban, M., Niazmand, S., Soukhtanloo, M., Meibodi, N.T. 2020. The preventive effect of *Nigella sativa* seed on gastric ulcer induced by indomethacin in rat. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 9(1): 12-19.
- Pérez-González, M.Z., Gutiérrez-Rebolledo G.A., Yépez-Mulia, L., Rojas-Tome I.S., Luna-Herrera, J., Jiménez-Arellanes M.A. 2017. Antiprotozoal, Antimycobacterial, and Anti-Inflammatory Evaluation of *Cnidoscopus Chayamansa* (Mc Vaugh) Extract and the Isolated Compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 89: 89-97.
- Pérez-González, M.Z., Macías-Rubalcava, M.L., Hernández-Ortega, S., Siordia-Reyes, A.G., Jiménez-Arellanes, M.A. 2019. Additional compounds and the therapeutic potential of *Cnidoscopus chayamansa* (McVaugh) against hepatotoxicity induced by antitubercular drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117, 109140.
- Pérez-Hernández, J., González-Cortazar, M., Marquina, S., Herrera-Ruiz, M. Meckes-Fischer, M., Tortoriello, J. Cruz-Sosa, F., Nicasio-Torres, M.P. 2014. Sphaeralcic Acid and Tomentin, Anti-Inflammatory Compounds Produced in Cell Suspension Cultures of *Sphaeralcea Angustifolia*. *Planta Medica* 80(2-3): 209-14.
- Raj, D.S., Pecoits-Filho, R., Kimmel, P.L. 2020. Inflammation in chronic kidney disease. In *Chronic Renal Disease* (pp. 355-373).
- Ramos-Gomez, M., Figueroa-Pérez, M.G., Guzmán-Maldonado, H., Loarca-Piña, G., Mendoza, S., Quezada-Tristán, T., Reynoso-Camacho, R. 2017. Phytochemical profile, antioxidant properties and hypoglycemic effect of chaya (*Cnidoscopus chayamansa*) in STZ induced diabetic rats. *Journal of Food Biochemistry*, 41(1):1-9.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. 2004. *Farmacología*. 5ta edición. Editorial Elsevier, España, pp. 217-260
- Robertson, K.D., Mehta, D. 2019. Esophageal Candidiasis. *StatPearls Publishing*. 2019: 1-11
- Romero-Cerecero, O., Meckes-Fischer, M., Zamilpa, A., Jiménez-Ferrer, J.E., Nicasio-Torres, P., Pérez-García, D., Tortoriello, J. 2013. Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea angustifolia* treatment in hand osteoarthritis. *Journal of ethnopharmacology*, 147(2): 467-473.
- Saimaru, H., Orihara, Y., Tansakul, P., Kang, Y. H., Shibuya, M., Ebizuka, Y. 2007. Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 55(5): 784-788.
- Senjobi, C.T., Moody, J.O., Ettu, A. O. 2011. Antimicrobial and cytotoxic effects of

*Cnidoscolus aconitifolius* (Miller) Johnson. *Journal of Agriculture and Biological* 2(2): 021-025.

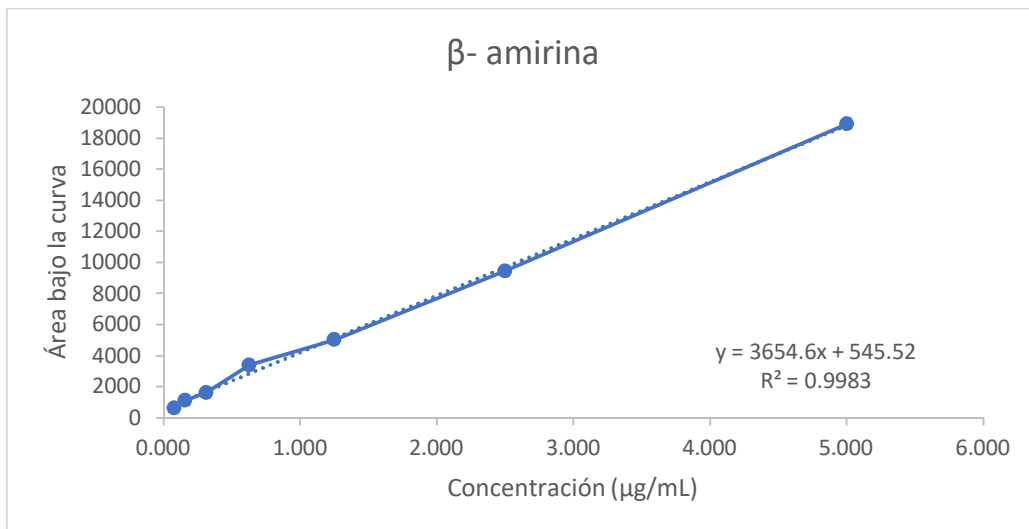
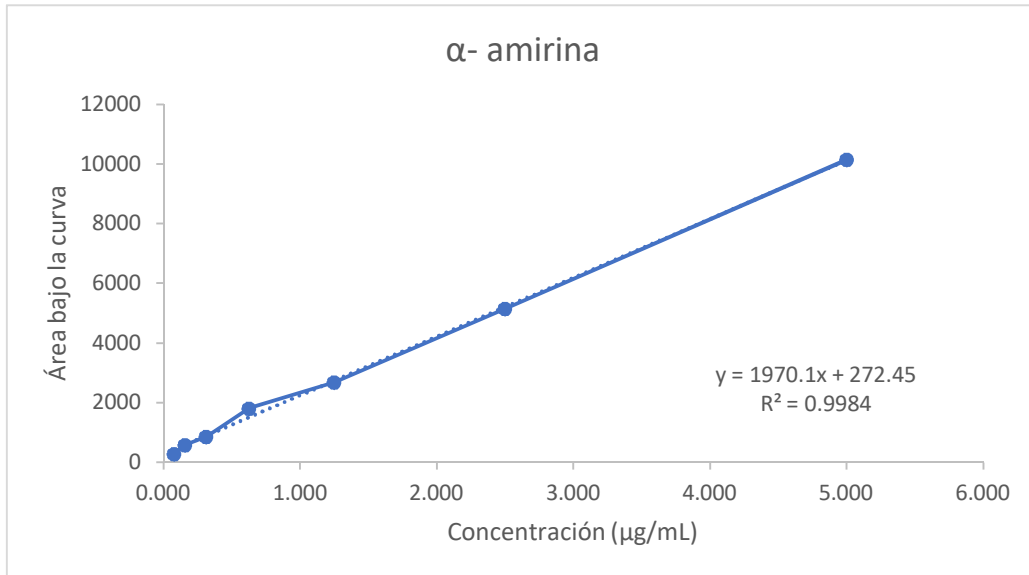
- Shah, R., Shah, M., Bansal, N., Manocha, D. 2014. Infliximab-induced aseptic meningitis. *The American journal of emergency medicine*, 32(12): 1560-1573.
- Shohael, A.M., Murthy, H.N., Hahn, E.J., Lee, H.L., Paek, K.Y. 2008. Increased eleutheroside production in *Eleutherococcus sessiliflorus* embryogenic suspension cultures with methyl jasmonate treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 38(2): 270-273.
- Smolen, J.S., Landewé, R., Breedveld, F.C., Buch, M., Burmester, G., Dougados, M., Emery, P., Gaujoux-Viala, C., Gossec L., Nam, J., Ramiro, S., Winthrop, K Wit, M., Althaha, D., Betteridge, N., Brijlsma, J.W.J., Boers, N., Buttgerit, F., Combe, B., Cutolo, M., Heijde, D. 2014. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Annals of the rheumatic diseases*, 73(3): 492-509.
- Sorrells, S.F., Sapolsky, R.M. 2007. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, behavior, and immunity*, 21(3), 259-272.

# Anexos

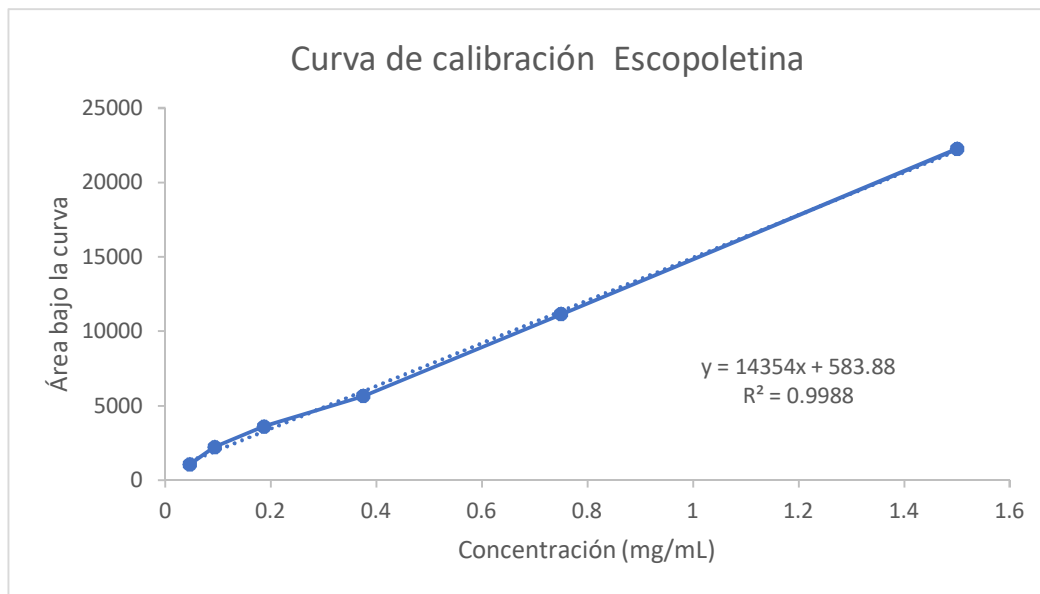
## Anexo 1: Curva de calibración de glucosa para el método Fenol-Sulfúrico



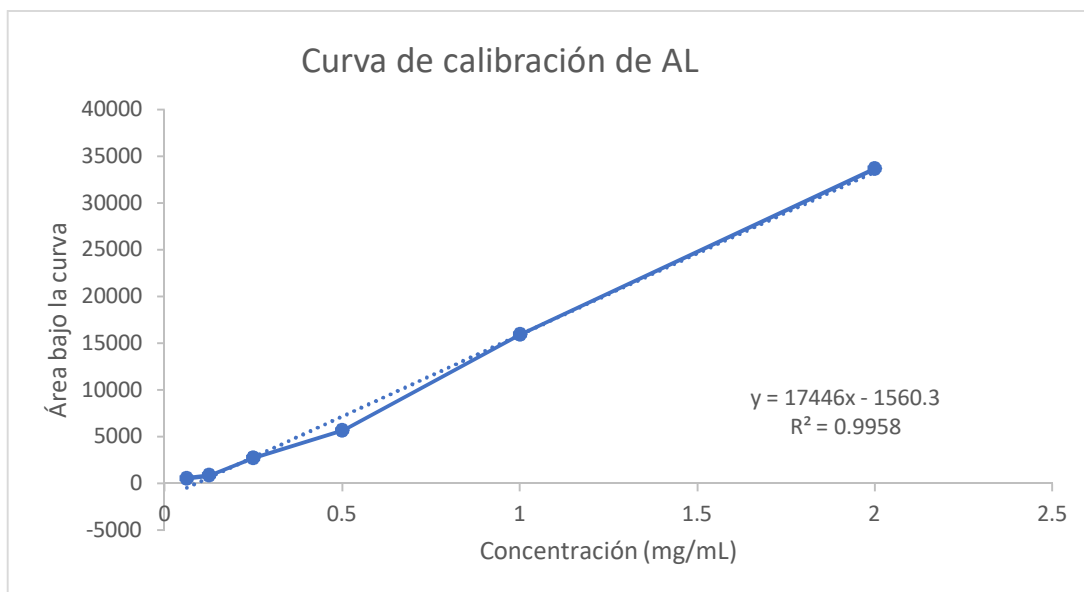
**Anexo 2: Curva de calibración para la cuantificación de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina.**



**Anexo 3: Curva de calibración para la cuantificación de SCO.**



**Anexo 4: Curva de calibración para la cuantificación de AL.**







Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00222

Matrícula: 2161800944

Determinación de la actividad antiinflamatoria de extractos de cultivos in-vitro de *Cnidioscolus chayamansa*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 12 del mes de marzo del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA  
DR. GABRIEL ALFONSO GUTIERREZ REBOLLEDO  
DRA. MARIANA SANCHEZ RAMOS  
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:



DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MARIANA ZULEIMA PEREZ GONZALEZ

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

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

MARIANA ZULEIMA PEREZ GONZALEZ  
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



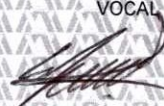
DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

VOCAL



DR. GABRIEL ALFONSO GUTIERREZ REBOLLEDO

VOCAL



DRA. MARIANA SANCHEZ RAMOS

SECRETARIA



DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO