



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

**Producción de compuestos antiinflamatorios en
cultivos transformados de *Sphaeralcea angustifolia***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

P R E S E N T A:

M. en C. Rogelio Reyes Pérez

TUTOR: Dr. José De Jesús Arellano García
COTUTOR: Dra. María del Pilar Nicasio Torres

Cuernavaca, Morelos

julio de 2022



DCN
Doctorado en
Ciencias Naturales

Agradecimientos



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

A el CONACYT por la beca otorgada.



IMSS

A el IMSS por la beca complementaria otorgada.



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

A el CEIB por aceptarme en el programa de Doctorado.



A el CIBIS por permirme realizar el proyecto de Doctorado en sus instalaciones.

1	Índice	
2	Agradecimientos.....	i
3	Índice.....	I
4	Índice de tablas.....	III
5	Índice de Figuras.....	IV
6	Abreviaturas.....	V
7	Resumen.....	VI
8	1. Introducción.....	XII
9	2. Antecedentes.....	1
10	2.1 Medicina tradicional.....	1
11	2.2 Planta de estudio: <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	1
12	2.3 Producción de compuestos activos de <i>S. angustifolia</i> mediante el cultivo de células en	
13	suspensión.....	4
14	2.3.1 Actividad antiinflamatoria de extractos y compuestos presentes en cultivos celulares de	
15	<i>S. angustifolia</i>	7
16	2.4 Cultivo de raíces transformadas.....	8
17	2.4.1 Metabolitos secundarios obtenidos mediante el cultivo de raíces transformadas.....	8
18	2.4.2 Generación de raíces pilosas.....	12
19	2.4.3 Mecanismo de la interacción entre células de plantas y <i>Agrobacterium</i>	12
20	2.4.4 Caracterización de los plásmidos de <i>A. rhizogenes</i>	13
21	2.4.4 Genes implicados en la formación de raíz pilosa.....	13
22	2.4.5 Formación de células indiferenciadas por la infección de <i>A. rhizogenes</i>	16
23	2.5 Incidencia de úlcera péptica en México.....	18
24	2.5.1 Inflamación y daño gástrico por úlceras.....	18
25	2.5.2 Úlceras producidas por fármacos antiinflamatorios no esteroideos.....	22
26	2.5.3 Úlceras producidas por etanol.....	23
27	2.5.4 Cumarinas con actividad gastroprotectora.....	24
28	3. Justificación.....	25
29	4. Hipótesis.....	26
30	5. Objetivos Generales.....	27
31	5.1 Objetivos particulares.....	27
32	6. Materiales y Métodos.....	28
33	6.1 Material vegetal de <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	28

34	6.1.1 Germinación <i>in vitro</i> de semillas	28
35	6.2 Inducción de raíces pilosas por <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	28
36	6.2.1 Individualización y selección de líneas de raíces pilosas	29
37	6.2.2 Establecimiento de cultivos líquidos de raíces pilosas y células en suspensión.....	30
38	6.2.3 Índice de crecimiento de raíces pilosas y células en suspensión	30
39	6.2.4 Confirmación de la transformación genética de raíces y células en suspensión.....	31
40	6.3 Efecto de ácido naftalenacético (ANA) sobre el crecimiento y producción de activos en	
41	cultivos de células en suspensión	31
42	6.4 Cuantificación de compuestos activos de raíces pilosas y células en suspensión.....	32
43	6.4.1 Extracción de biomasa	32
44	6.4.2 Extracción del medio de cultivo	32
45	6.4.3 Condiciones de HPLC.....	33
46	6.5 Análisis y fraccionamiento químico del extracto CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH de células en suspensión	
47	transformadas.....	33
48	6.6 Actividad antiulcerogénica	34
49	6.6.1 Animales	34
50	6.6.2 Úlceras gástricas	35
51	7. Resultados	37
52	7.1 Germinación <i>in vitro</i>	37
53	7.2 Inducción de raíces pilosas por <i>A. rhizogenes</i>	37
54	7.2.1 Individualización y selección de líneas de raíces pilosas	40
55	7.2.2 Establecimiento de cultivos líquidos de raíces pilosas	40
56	7.2.3 Índice de crecimiento.....	41
57	7.2.4 Confirmación de la transformación genética	41
58	7.3 Análisis de compuestos activos de raíces pilosas.....	42
59	7.4 Cultivo de células en suspensión.....	49
60	7.4.1 Producción de ácido sphaerálcico en cultivo de células en suspensión.....	50
61	7.4.2 Efecto de la concentración de ANA sobre la producción de escopoletina y ácido	
62	sphaerálcico en cultivos de células en suspensión transformadas de <i>S. angustifolia</i>	53
63	7.5 Identificación de compuestos por HPLC en el extracto CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH del cultivo de	
64	células en suspensión transformadas de <i>S. angustifolia</i>	58
65	7.5.1 Identificación química de los compuestos 1 y 2 presentes en el extrado CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH	
66	59

67	7.6 Efecto del extracto CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH de células en suspensión transformadas de <i>S.</i>	
68	<i>angustifolia</i> en un modelo de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto en ratón	66
69	8. Conclusión General	69
70	9. Referencias	70
71	10. Productividad del Proyecto	77
72		

73 Índice de tablas

74	Tabla 1 Rendimiento de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico reportados en cultivo de	
75	células en suspensión y planta silvestre de <i>S. angustifolia</i>	6
76	Tabla 2. Producción de compuestos activos en cultivos de raíces transformadas versus otros	
77	cultivos.	11
78	Tabla 3. Sistema de elución en gradiente empleado en el fraccionamiento en columna abierta del	
79	extracto CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH de células en suspensión transformadas de <i>S. angustifolia</i>	34
80	Tabla 4. Respuesta de explantes de hojas y segmentos nodales de plántulas de 2 meses de <i>S.</i>	
81	<i>angustifolia</i> a la infección por cepas de <i>A. rhizogenes</i>	37
82	Tabla 5. Índice de crecimiento de líneas de raíces pilosas de <i>S. angustifolia</i> transformadas con <i>A.</i>	
83	<i>rhizogenes</i> ATCC 15834/pTDT.	41
84	Tabla 6. Acumulación de escopoletina y ácido sphaerálcico en cultivos de raíces pilosas de <i>S.</i>	
85	<i>angustifolia</i>	44
86	Tabla 7. Excreción de escopoletina y ácido sphaerálcico al medio de cultivo de raíces pilosas de	
87	<i>S. angustifolia</i>	45
88	Tabla 8. Producción de escopoletina y ácido sphaerálcico por biomasa total en cultivo de raíces	
89	pilosas de <i>S. angustifolia</i>	46
90	Tabla 9. Índice de crecimiento de cultivos de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i>	49
91	Tabla 10. Producción de escopoletina y ácido sphaerálcico en cultivos de suspensiones celulares	
92	de <i>S. angustifolia</i>	52
93	Tabla 11. Índice de crecimiento de células en suspensión transformadas de <i>S. angustifolia</i>	
94	cultivadas con diferentes concentraciones de ANA.	53
95	Tabla 12. Producción de escopoletina y ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión	
96	transformadas por <i>A. rhizogenes</i> cultivadas con diferentes concentraciones de ANA.	54
97	Tabla 13. Rendimiento de la excreción de ácido sphaerálcico y escopoletina al medio de cultivo	
98	de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i>	54
99	Tabla 14. Datos de RMN de ¹ H y ¹³ C de 8-O-ramnósido de fraxetina (compuesto 1 , 600 y 150	
100	MHz, CD ₃ OD) y comparación con la literatura.	61
101	Tabla 15. Datos de RMN de ¹ H y ¹³ C de 8-O-glucopiránósido de 3,6,7-trimetoxicumarina	
102	correspondiente al compuesto 2 (600 y 150 MHz, CD ₃ OD).	64
103	Tabla 16. Efecto del extracto de células en suspensión transformadas en un modelo de úlcera	
104	gástrica inducida por etanol absoluto en ratón.	66
105		

106	Índice de Figuras	
107	Figura 1. Fotografía de <i>S. angustifolia</i> tomada en la comunidad de Huichapan, Hidalgo, México.	
108	2
109	Figura 2. Estructura química de compuestos antiinflamatorios producidos en células en	
110	suspensión de <i>S. angustifolia</i>	6
111	Figura 3. Representación esquemática de la síntesis de prostaglandina E ₂ , (PGE ₂) y	
112	prostaciclina (PGI ₂).....	19
113	Figura 4. Representación esquemática de la glándula oxíntica gástrica a) y Célula Parietal	
114	gástrica b).	21
115	Figura 5. Posibles mecanismos por los cuales se puede producir alteraciones en la secreción	
116	gástrica	22
117	Figura 6. Inducción de raíces pilosas en explantes de hojas y segmentos nodales de plántulas de	
118	<i>S. angustifolia</i>	39
119	Figura 7. Productos de PCR de líneas de raíces pilosas transformadas de <i>S. angustifolia</i>	42
120	Figura 8. Cromatogramas de HPLC y espectros de absorción de estándares.	43
121	Figura 9. Confirmación de la inserción del gen rolC en el genoma de línea celular SaH3.1 de <i>S.</i>	
122	<i>angustifolia</i>	50
123	Figura 10. Cromatogramas y espectros de absorción del extracto CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH de cultivos en	
124	suspensión de células transformadas de <i>S. angustifolia</i>	51
125	Figura 11. Biosíntesis del ácido 1,4 dihidroxy-2 naftoico y estructuras químicas del ácido	
126	sphaerálcico y ácido naftalenacético.	56
127	Figura 12. Cromatogramas y espectros de absorción de esculina y de compuestos mayoritarios	
128	detectados en el extracto CH ₂ Cl:CH ₃ OH obtenido de las células en suspensión transformadas de	
129	<i>S. angustifolia</i>	58
130	Figura 13. Cromatogramas de HPLC y CCF de los compuestos 1 y 2	59
131	Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) de 8- <i>O</i> -ramnósido de Fraxetina	
132	(compuesto 1).	60
133	Figura 15. Espectro de RMN de ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) de 8- <i>O</i> -ramnósido de fraxetina	
134	(compuesto 1).	60
135	Figura 16. Estructura química de 8- <i>O</i> -ramnósido de fraxetina (1)	62
136	Figura 17. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) 8- <i>O</i> -glucopiranosido de 3,6,7-	
137	trimetoxicumarina (2).	63
138	Figura 18. Espectro de RMN de ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) de 8- <i>O</i> -glucopiranosido de 3,6,7-	
139	trimetoxicumarina (2).	63
140	Figura 19. Estructura química de 8- <i>O</i> -glucopiranosido de 3,6,7-trimetoxicumarina (2).....	64
141	Figura 20. Fotografías de estómago de ratón después de inducir las úlceras con etanol.	66
142		
143		

144	Abreviaturas	
145	ACF	Adyuvante Completo de Freund
146	ADN-T	Ácido Desoxirribonucleico de Transferencia
147	AIB	Ácido Indol Butírico
148	AINES	Antiinflamatorios No Esteroidales
149	ANA	Ácido Naftalenacético
150	C/C	Caolín/ λ -Carragenina
151	CCA	Cromatografía en Columna Abierta
152	CCF	Cromatografía en Capa Fina
153	COX	Ciclooxigenasa
154	DE₅₀	Dosis efectiva media
155	HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
156	IC	Índice de Crecimiento
157	IL	Interleucinas
158	ICS	Isocorismato Sintasa
159	Kin	Kinetina
160	MS	Murashige and Skoog
161	NF-$\kappa$$\beta$	Inhibidor del Factor de Transcripción Nuclear
162	OFR	Marco de Lectura Abierta (Por sus siglas en ingles)
163	PF	Peso Fresco
164	PS	Pesos Seco
165	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
166	TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
167	TPA	Acetato de tetradecanoilforbol
168	UD	Úlceras duodenales
169	UG	Úlceras gástricas
170	UP	Úlceras pépticas
171	2,4,5-T	Ácido 2, 4, 5- triclorofenoxiacético
172	2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

173 **Resumen**

174 *Sphaeralcea angustifolia* es una planta utilizada tradicionalmente para el tratamiento de procesos
175 inflamatorios y problemas gastrointestinales. El extracto diclorometano de tejidos aéreos de esta
176 especie resultó ser activo como antiinflamatorio e inmunomodulador en modelos de inflamación
177 aguda (acetato de tetradecanoilforbol, TPA) y crónica (adjuvante completo de Freund, ACF) en
178 ratón. La cumarina conocida como escopoletina aislado del extracto se ha reportado como
179 antiinflamatorio, inmunomodulador, inhibidor angiogénico y revertir las alteraciones
180 histopatológicas en el modelo de artritis en ratas inducida por ACF. El cultivo de células en
181 suspensión de *S. angustifolia* ha sido explorado como sistema de producción de escopoletina; en
182 donde también se indujo la síntesis de tomentina y ácido sphaerálcico. Los extractos
183 diclorometano-metanol de biomásas celulares, tomentina y ácido sphaerálcico presentaron
184 actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora en modelos de inflamación (TPA y λ -carragenina)
185 y artritis inducida por caolín/ λ -carragenina (C/C) en ratones. La producción de escopoletina y ácido
186 sphaerálcico se optimizó en las suspensiones celulares por restricción de nitratos en el medio de
187 cultivo de Murashigue y Skoog (MS) y el bio-proceso celular se escaló a biorreactor de agitación
188 mecánica de 2L.

189 Con base a la estabilidad bioquímica y genética de los cultivos de raíces transformadas con
190 *Agrobacterium rhizogenes*, se propuso la obtención de raíces pilosas de *S. angustifolia* como un
191 sistema biotecnológico productor de compuestos activos. Se evaluaron 2 cepas *A. rhizogenes* de
192 tipo agropina (ATCC 15834/pTDT y A4/pTDT) y una de tipo cucumopina (K599/pTDT). La
193 mayor frecuencia de transformación mediada por *A. rhizogenes* ATCC 15834/pTDT se obtuvo con
194 segmentos nodales (59.5 ± 10.5 %) y hojas (40.0 ± 25 %) de plántulas de 2 meses de edad. Se
195 seleccionaron 6 líneas de raíces pilosas provenientes de nodo (SaTR N) y 1 de hoja (SaTR H) con
196 base a sus características fenotípicas e índice de crecimiento; así como una línea de callo
197 proveniente de hoja. La transformación genética de las raíces pilosas y callo se confirmó
198 amplificando un fragmento de 490 pb del gen *rolC*. El índice de crecimiento entre las 7 líneas de
199 raíces pilosas en medio líquido fue diferente, siendo la línea SaTR N 5.1 la línea con mayor
200 crecimiento. La línea SaTR N7.2 presentó la mayor producción de ácido sphaerálcico (17.6 ± 1.72
201 mg/g PS), cuyo rendimiento fue superior a los reportados en planta silvestre (440 veces), en
202 suspensiones celulares cultivadas en medio MS con restricción de nitrato en matraces (263 veces)
203 y en biorreactor tipo tanque agitado (5 veces); sin embargo, esta línea de raíz pilosa presentó el

204 índice de crecimiento más bajo, posiblemente debido a que la sobreproducción afectó
205 negativamente su crecimiento por un efecto tóxico. Las líneas SaTR N7.2, SaTR N5.1, SaTR N7.1
206 y SaTR N15.1 excretaron ácido sphaerálcico en el medio de cultivo a niveles similares. Después
207 de 2 años en cultivo, las raíces pilosas de *S. angustifolia* provenientes de nodo siguen produciendo
208 escopoletina y ácido sphaerálcico. La línea de raíces pilosas SaTR H2.2 proveniente de hoja no
209 produjo los compuestos activos.

210 El callo desarrollado en un explante de hoja de *S. angustifolia* en el sitio de infección con *A.*
211 *rhizogenes* mostró crecimiento constante en medio MS sin reguladores de crecimiento vegetal; con
212 este tejido de callo se estableció el cultivo de células en suspensión (línea SaH3.1) en medio MS
213 libre de reguladores de crecimiento. En paralelo, células transformadas en suspensión (SaH3.1) y
214 células no transformadas en suspensión de callo generado de hojas de *S. angustifolia* se cultivaron
215 en medio MS con 1mg/L ácido naftalenáctico (ANA) y 0.1 mg/L de Kinetina (Kin). El índice de
216 crecimiento de los cultivos de células transformadas en suspensión (SaH3.1) libre de hormonas y
217 con la adición de ANA y Kin fue superior a los obtenidos en el cultivo de células en suspensión no
218 transformadas. Ácido sphaerálcico se detectó únicamente en los cultivos celulares transformados
219 (SaH3.1), y con la adición de ANA al medio MS se duplicó la producción de ácido sphaerálcico
220 (0.39 ± 0.11). Con base a estos resultados se evaluó el efecto de la adición de ANA (1, 2 y 4 mg/L)
221 sobre el crecimiento y producción de activos en la suspensión celular SaH3.1. En la primera semana
222 de cultivo, la mayor acumulación y excreción de ácido sphaerálcico se obtuvo con la concentración
223 de 4 mg/L de ANA. La acumulación y excreción de ácido sphaerálcico y escopoletina se redujo en
224 las semanas 2 y 3 del cultivo. Con base a la similitud estructural de ANA y el ácido 1,4-
225 dihidroxinaftoico, derivado naftoico obtenido a partir de *p*-hidroxibenzoico, se postuló que ANA
226 podría actuar como precursor en la biosíntesis del ácido sphaerálcico.

227 En el análisis por HPLC del extracto diclorometano: metanol de células en suspensión
228 transformadas se observó la presencia de 2 compuestos mayoritarios que no han sido reportados en
229 planta silvestre, un compuesto (**1**) con tiempo de retención de 7.84 min y absorción máxima de
230 $\lambda=341$ y 213.4 nm; el segundo compuesto (**2**) con tiempo de retención de 10.39 min y máxima
231 absorción a $\lambda=377.8$ y 214.5 nm. Del fraccionamiento en columna abierta del extracto
232 CH₂Cl₂:CH₃OH de las células en suspensión transformadas con el sistema de gradientes de
233 H₂O:CH₃CN, se aislaron los compuestos **1** y **2** en las reuniones 3 (90:10) y 9 (70:30),

234 respectivamente. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos **1** y **2** nos determina que
235 corresponde a derivados de fraxetina denominado 8-*O*-ramnósido de fraxetina (**1**) y 8-*O*-
236 glucopiranosido de 3,6,7-trimetoxicumarina (**2**).

237 El extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (100 mg/kg) mostró un efecto gastroprotector ($82.01 \pm 3.42\%$) similar
238 al del control positivo omeprazol (86.66 ± 12.36 ; 20 mg/kg) en el modelo de úlceras gástricas
239 inducidas con etanol en ratón. El efecto gastroprotector puede ser atribuído a las cumarinas
240 presentes en el extracto como la escopoletina y los compuestos aislados **1** y **2**. Las cumarinas son
241 reportadas como antiinflamatorios, por ejemplo, la cumarina y su derivado 7-hidroxi inhiben la
242 biosíntesis de prostaglandinas; además, se ha demostrado que esculetina, fraxetina, dafnetina,
243 escopoletina y otros derivados de cumarinas son reconocidos como inhibidores enzimáticos de la
244 lipoxigenasa y la ciclooxigenasa, así como de la bomba de protones H^+/K^+ -ATPasa.

245

246 **Abstract**

247 *Sphaeralcea angustifolia* is a plant traditionally used for the treatment of inflammatory processes
248 and gastrointestinal problems. The dichloromethane extract from aerial tissues of this species was
249 active as anti-inflammatory and immunomodulator in mouse models of acute
250 (tetradecanoylphorbol acetate, TPA) and chronic (Freund's complete adjuvant, FCA)
251 inflammation. The scopoletin, the active compound isolated from the extract, has been reported as
252 anti-inflammatory, immunomodulatory, angiogenic inhibitory and reversal of histopathological
253 alterations in the ACF-induced arthritis model in rats. Cell in suspension culture of *S. angustifolia*
254 was explored as a production system for scopoletin; besides, the tomentin and sphaeralcic acid
255 synthesis was induced. Dichloromethane-methanol extracts of cell biomass, tomentin and
256 sphaeralcic acid demonstrated anti-inflammatory and immunomodulatory activity in models of
257 inflammation (TPA and λ -carrageenan) and arthritis induced by kaolin/ λ -carrageenan (C/C) in
258 mice. The production of scopoletin and sphaeralcic acid was optimized in the cells in suspensions
259 by reduction of nitrate concentration in the Murashigue and Skoog (MS) culture medium and the
260 cell bioprocess was scaled up to a mechanical agitation bioreactor of 2.0 L.

261 Based on the biochemical and genetic stability of transformed root with *Agrobacterium rhizogenes*,
262 obtaining hairy roots of *S. angustifolia* was proposed as a biotechnological system to produce active
263 compounds. Two *A. rhizogenes* strains of agropine type (ATCC 15834/pTDT and A4/pTDT) and
264 one of cucumopine type (K599/pTDT) were evaluated. The highest frequency of transformation
265 mediated by *A. rhizogenes* ATCC 15834/pTDT was obtained with nodal segments (59.5 ± 10.5 %)
266 and leaves (40.0 ± 25 %) of 2-month-old seedlings. Six hairy root lines from node (SaTR N) and
267 one from leaf (SaTR H) were selected based on their phenotypic characteristics and growth index;
268 as well as a line of callus from leaf. Genetic transformation of hairy roots and callus was confirmed
269 by amplifying a 490 bp fragment of the *rolC* gene. The growth index among the 7 hairy root lines
270 in liquid medium was different, being the SaTR N 5.1 line with highest growth. The SaTR N7.2
271 line presented highest production of sphaeralcic acid (17.6 ± 1.72 mg/g PS), whose yield was higher
272 than those reported in the wild plant (440 times), in cell suspensions cultured in MS medium with
273 nitrate restriction in flasks (263 times) and stirred tank type bioreactor (5 times); however, this
274 hairy root line had the lowest growth index, possibly because overproduction negatively affected
275 its growth due to a toxic effect. The SaTR N7.2, SaTR N5.1, SaTR N7.1 and SaTR N15.1 lines
276 excreted sphaeralcic acid in the culture medium at similar levels. After 2 years in culture, hairy

277 roots of *S. angustifolia* from the node continue to produce scopoletin and sphaeralcic acid. The line
278 of hairy roots from the leaf (SaTR H2.2) did not produce the active compounds.

279 Callus developed on the site of infection of *S. angustifolia* leaf explant with *A. rhizogenes* showed
280 constant growth in MS medium without plant growth regulators; with this callus tissue, cells in
281 suspension (SaH3.1 line) was established in MS medium free of growth regulators. In parallel,
282 transformed cells in suspension (SaH3.1) and non-transformed cells in suspension from leaf callus
283 of *S. angustifolia* were cultivated in MS medium with 1mg/L naphthaleneacetic acid (NAA) and
284 0.1 mg/L Kinetin (Kin). The growth index of transformed cell suspension (SaH3.1) cultures free
285 of hormones and with the addition of NAA and Kin was higher than that obtained in the non-
286 transformed cell in suspension culture. Sphaeralcic acid was detected only in the transformed cell
287 (SaH3.1) cultures and with the addition of NAA the production of sphaeralcic acid was doubled
288 (0.39 ± 0.11). Based on these results, the effect of NAA adding (1, 2 and 4 mg/L) on the growth and
289 production of active compounds in the SaH3.1 cell in suspension was evaluated. In the first week
290 of culture, the highest accumulation and excretion of sphaeralcic acid was obtained with a
291 concentration of 4 mg/L of NAA. Accumulation and excretion of sphaeralcic acid and scopoletin
292 were reduced after 2 and 3 weeks of culture. Based on the structural similarity of NAA and 1,4-
293 dihydroxynaphthoic acid, a naphthoic derivative obtained from *p*-hydroxybenzoic acid, it was
294 postulated that NAA could act as a precursor in the biosynthesis of sphaeralcic acid.

295 In the HPLC chromatogram of dichloromethane:methanol extract of transformed cells (SaH3.1) in
296 suspension, the presence of 2 main compounds not yet reported in the wild plant was observed;
297 one compound (**1**) with a retention time of 7.84 min and a maximum absorption of $\lambda=341$ and 213.4
298 nm; the second compound (**2**) with a retention time of 10.39 min and maximum absorption at
299 $\lambda=377.8$ and 214.5 nm. From open column chromatography fractionation of
300 dichloromethane:methanol extract of transformed cells in suspension with the H₂O:CH₃CN
301 gradient system, compounds 1 and 2 were isolated in fractions 3 (90:10) and 9 (70:30), respectively.
302 The ¹H and ¹³C NMR spectra of compounds **1** and **2** characterize them as derivatives of fraxetin
303 named fraxetin 8-*O*-rhamnoside (**1**) and 8-*O*-glucopyranoside 3,6,7-trimethoxycoumarin (**2**).

304 The dichloromethane:methanol extract (100 mg/kg) showed a gastroprotective effect ($82.01 \pm$
305 3.42%) like that of omeprazole (86.66 ± 12.36 ; 20 mg/kg) in the ethanol-induced gastric ulcer
306 model in mice. The gastroprotective effect can be attributed to the coumarins present in the extract,

307 such as scopoletin and isolated compounds **1** and **2**. Coumarins are reported as anti-inflammatory,
308 for example, coumarin and its 7-hydroxy derivative inhibit prostaglandin biosynthesis. In addition,
309 esculetin, fraxetin, daphnetin, scopoletin and other coumarin derivatives have been shown to be
310 recognized as enzyme inhibitors of lipoxygenase and cyclooxygenase, as well as inhibitor of
311 H^+/K^+ -ATPase pump.

312

313 **1. Introducción**

314 *Sphaeralcea angustifolia* (Cav) G. Don (Malvaceae) es conocida en México como “Vara de San
315 José” o “Hierba del negro” (Aguilar et al. 1994). Esta planta se usa en la medicina tradicional
316 mexicana para tratar golpes, fracturas, inflamaciones y problemas gástricos (Aguilar et al. 1994;
317 Argueta et al. 1994). Los extractos de tejidos aéreos de esta planta han demostrado tener actividad
318 antiinflamatoria, identificando a la escopoletina como principal compuesto activo (Meckes et al.
319 2004; Juárez-Ciriaco et al. 2008; García-Rodríguez et al. 2012). La administración tópica de una
320 formulación en gel preparada con extracto de diclorometano de tejidos aéreos de *S. angustifolia* al
321 1 % y estandarizado en el contenido de escopoletina mostró eficacia terapéutica y tolerabilidad en
322 pacientes con osteoartritis en manos, capaz de reducir los síntomas asociados como son el dolor, la
323 inflamación y rigidez articular (Romero-Cerecero et al. 2013).

324 La escopoletina se ha aislado de muchas plantas (Jain et al. 2002) y se han informado importantes
325 actividades farmacológicas, como antiinflamatoria (Moon et al. 2007; Ding et al. 2008),
326 antioxidante (Shaw et al. 2003; Gwak et al. 2011), inhibidor del factor de transcripción nuclear
327 (NF- κ B) y producción de citocinas antiinflamatorias, así como mediadores pro-inflamatorios (Kim
328 et al. 2004; Deng et al. 2007), antiangiogénico en modelo de ratón con artritis (Pan et al. 2009),
329 antiproliferativo (Thani et al. 2010), antitiroideo, antihipertensivo (Aldi et al. 2015),
330 antihiperuricémico (Zeng et al. 2020) y antidiabéticos (Jang et al. 2020), entre otros.

331 Los compuestos farmacéuticos de las plantas se pueden obtener por extracción directa de cortezas,
332 tallos, hojas, flores o frutos de plantas, generalmente con bajos rendimientos; además, estos
333 compuestos usualmente tienen estructuras muy complicadas y algunos de ellos no pueden
334 sintetizarse usando un método orgánico. La escopoletina está presente en concentraciones bajas en
335 la planta de *S. angustifolia*, motivo por el cual se estableció un cultivo de células en suspensión de
336 esta especie como una metodología factible para mejorar la producción de este compuesto. Los
337 reportes indican que además de producir escopoletina, del extracto diclorometano-metanol de las
338 células en suspensión cultivadas bajo restricción de nitratos se aislaron tomentina y ácido
339 sphaerálcico, ambos compuestos se identificaron como potentes antiinflamatorios en modelos
340 agudos y crónicos de ratones (Pérez-Hernández et al. 2014; Nicasio-Torres et al. 2017). Ambos
341 compuestos fueron capaces de modular la producción de citocinas pro y antiinflamatorias (Serrano-
342 Román 2015; Nicasio-Torres et al. 2017). Asimismo, se reportó la actividad antioxidante de la
343 tomentina aislada de la corteza del tallo de *Jatropha podagrica* (Minh et al., 2019). La producción

344 de ácido sphaerálcico en cultivo de células en suspensión se amplió a biorreactor de tanque agitado
345 obteniendo rendimientos de 3.47 mg/g PS (Pérez-Hernández et al. 2019a). El cultivo de células
346 vegetales se considera una opción potencial para la producción de compuestos activos, sin
347 embargo, solo se han establecido unos pocos sistemas comerciales a gran escala debido al bajo
348 rendimiento de metabolitos secundarios o a la pérdida de la capacidad de acumular estos
349 compuestos parcial o totalmente (Caili y Meizhe 2021). Entonces, es importante explorar otros
350 procesos biotecnológicos para la producción de compuestos con importante actividad antiartrítica
351 identificados en cultivos celulares de *S. angustifolia*: escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico.
352 La transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes* se ha utilizado para establecer
353 cultivos de raíces transformadas de muchas plantas medicinales, tanto para la producción de
354 compuestos activos identificados en las plantas silvestres como para la generación de nuevos
355 compuestos activos. En cultivos de raíces pilosas se ha logrado la producción de algunos
356 metabolitos sintetizados solo en tejidos específicos, por ejemplo, vinblastina y vincristina
357 producidas exclusivamente en las partes aéreas de plantas de *Catharanthus roseus*, y catarantina
358 acumulada en todos los órganos (Schweizer et al. 2018).

359 Los cultivos de raíces transformadas genéticamente se consideran una importante herramienta
360 biotecnológica para la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica debido a que
361 poseen estabilidad genética y bioquímica, su capacidad de crecer en medios libres de reguladores
362 de crecimiento vegetal y a sus tiempos de duplicación cortos, atributos que les otorgan ventajas
363 sobre los cultivos de células en suspensión (Rajashekar et al. 2016; Gutierrez-Valdes et al. 2020).

364 Para la producción de compuestos activos en cultivos de raíces pilosas se deben considerar algunos
365 factores, como son la estabilidad de los compuestos y su toxicidad para el cultivo, además del costo
366 que implica su producción (Shi et al. 2021). Otro factor que considerar es la estabilidad de las raíces
367 pilosas para la producción de grandes cantidades de compuestos activos en cada subcultivo a lo
368 largo del tiempo.

369 Es importante explorar los cultivos de raíces pilosas para la producción de compuestos con
370 importante actividad antiartrítica, escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico, identificados en
371 cultivos celulares en suspensión de *S. angustifolia*. Considerando que no existen reportes en la
372 literatura sobre la transformación genética de *S. angustifolia*, se utilizaron como punto de partida
373 los reportes de algunas especies de la familia Malvaceae transformadas por cepas de *A. rhizogenes*
374 ATCC 15834. Entre dichas especies encontramos *Gossypium hirsutum* L. y *Gossypium barbadense*

375 L. (Triplett et al. 2008); *Abutilon indicum* L. (malva india; Sajjalaguddam y Paladugu 2016);
376 *Althaea officinalis* L. (malvavisco; Tavassoli y Safipour Afshar 2018); y *Urena lobata* L. (Phuong
377 et al. 2018). Con base en lo anterior, se decidió establecer un protocolo de transformación de *S.*
378 *angustifolia* utilizando cepas de *A. rhizogenes* y seleccionando líneas de raíces pilosas con el mejor
379 índice de crecimiento y alta producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico como base
380 para el desarrollo de un sistema biotecnológico industrial competitivo en el futuro.

381 Del mismo modo se estableció un cultivo de células en suspensión, producto de la infección de un
382 explante de hoja con *A. rhizogenes* generando callo en el sitio de herida que sostuvo un crecimiento
383 en medio semisólido libre de reguladores de crecimiento vegetal. El efecto gastroprotector del
384 extracto diclorometano: metanol del cultivo de células en suspensión se evaluó en un modelo de
385 úlcera gástrica inducida por etanol absoluto en ratón.

386

Antecedentes

387 2. Antecedentes

388 2.1 Medicina tradicional

389 El uso de terapias complementarias, que incluyen los remedios con plantas, es una práctica común
390 a nivel mundial. La medicina tradicional es importante en la cosmovisión de los pueblos indígenas
391 y representa el conocimiento milenario sobre el uso de plantas medicinales que los indígenas han
392 resguardado de valor incalculable que fortalece y preserva su identidad. La medicina tradicional
393 mexicana es un mosaico de piezas procedentes de culturas diferentes que han determinado
394 históricamente el desarrollo de la cultura nacional. La cultura de México actual proviene del
395 sincretismo que se produjo entre las culturas prehispánica y española fusionadas a finales del siglo
396 XVI (Jiménez-Silva, 2017).

397 En la medicina tradicional mexicana se utilizan las diferentes partes de la planta, según sea la
398 afectación, lo más común es usar las hojas y las flores, esporádicamente, el tallo o la raíz. Las
399 plantas medicinales se consumen directamente o pueden prepararse como infusiones o en
400 presentación homeopática (Guzmán et al., 2017).

401 La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud del ser
402 humano; no obstante, en la mayoría de las especies de plantas utilizadas se desconoce el o los
403 principios activos químicos relacionados con los efectos benéficos que se les atribuyen. En años
404 recientes, diversos grupos de investigación realizan esfuerzos para identificar compuestos con
405 actividad biológica en un intento de aportar mayor conocimiento a este campo (Jiménez-Silva,
406 2017).

407

408 2.2 Planta de estudio: *Sphaeralcea angustifolia*

409 *Sphaeralcea angustifolia* crece en forma natural en climas cálidos, semicálidos, áridos y templados
410 entre los 1,890 y los 3,900 msnm asociada a pastizales, bosque de encino, pino, pino-encino,
411 matorrales xerófilos y a terrenos agrícolas con una distribución disyunta. Se localiza en la parte
412 occidental de Estados Unidos, en el Norte y centro de México, en Argentina y países adyacentes
413 (Martínez, 1979; Villaseñor et al. 1998; Mcvaugh, 2001).

Antecedentes

414 Taxonómicamente la especie *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don se clasificó en el orden de
415 las Malvales, la familia Malvaceae, Subfamilia Malvoideae y género *Sphaeralcea* (National Center
416 for Biotechnology Information/Taxonomy).

417 *Sphaeralcea angustifolia* (*S. angustifolia*) es una planta herbácea o frutescente (**Figura 1**),
418 diminutamente pubescente, erecta de 0.5 a 1.5 m de alto; hojas angostamente lanceoladas de 5 a
419 12 cm de longitud, 4 a 6 veces más largas que anchas, crenadas, a veces astado-lobuladas;
420 inflorescencia en forma de panícula angosta racemiforme, con hojas dentadas reducidas hacia el
421 segmento superior; bractéolas de cálculo filiformes, más cortas que el cáliz; cáliz de 7 a 8 mm de
422 longitud, pubescente; pétalos de 8 a 12 mm de longitud morados o rosados, androceo usualmente
423 purpúreo, la columna pubescente; frutos por lo general inclusos en el cáliz, truncado-cónicos,
424 mericarpios 10 a 16, de ordinarios connados en la madurez; semillas 1 a 3 generalmente glabras
425 (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

426



427

428 **Figura 1.** Fotografía de *S. angustifolia* tomada en la comunidad de Huichapan, Hidalgo, México.

Antecedentes

429 En México se le conoce con diferentes nombres comunes dependiendo de la región donde crece,
430 en la zona del Valle del Mezquital Hidalgo como “vara de San José”, en el Estado de México
431 “hierba del negro” (Aguilar et al., 1994) y duraznillo cimarrón en Querétaro (Arreguín et al., 1997).
432 También se conoce como cordón, hierba negra, hierba del golpe, pintapan y en lengua náhuatl con
433 el nombre de “tlixihuitl” (Martínez, 1979; Villaseñor et al. 1998; Mcvaugh, 2001).

434 Esta planta se utiliza en la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones que involucran
435 procesos inflamatorios. En el Estado de Durango se utiliza para tratar golpes, torceduras, fracturas
436 o heridas, utilizando los tejidos aéreos de la planta machacada o triturada con unas gotitas de aceite
437 sobre la herida; también se sugiere el uso de ramas fritas en cebo o aceite cubriendo el golpe con
438 un lienzo. Para heridas como granos, cortadas y descalabradas, se utiliza una infusión de la raíz o
439 “camotito” machacado de la vara de San José, una o dos pencas desmenuzadas de sábila, la tuna
440 abierta del cardón y un pedazo de cáscara (corteza) de palma; también se recomienda para lavar las
441 heridas tres veces al día y tomar en ayunas este té. Otro uso que se le da a esta planta es en trastornos
442 digestivos y/o padecimientos gastrointestinales como la disentería y el dolor de estómago (Argueta
443 et al., 1994).

444 En la búsqueda de plantas con potencial efecto antiinflamatorio de la flora medicinal de México,
445 se evaluó la actividad antiinflamatoria de extractos de diferente polaridad de 14 plantas en el
446 modelo de edema subplantar en rata inducido por λ -carragenina, siendo el extracto
447 cloroformo/diclorometano de *S. angustifolia* uno de los extractos más activos (Meckes et al., 2004).
448 Continuando con el estudio de la especie, se demostró que la administración del extracto de
449 diclorometano a una dosis de 100 mg/kg por día, durante 8 días, produjo una inhibición sostenida
450 y significativa (62.6 %) del edema articular en ratas con inflamación crónica inducida con
451 adyuvante completo de Freund (ACF); además, la aplicación tópica del extracto de diclorometano
452 redujo la formación del edema de oreja de ratón (50.6 %) inducido con acetato de
453 tetradecanoilforbol (TPA). En este sentido, se demuestran efectos tanto sistémicos como tópicos
454 en el extracto de diclorometano de *S. angustifolia* en modelos experimentales de inflamación
455 crónica. Las fracciones activas derivadas del extracto de diclorometano contenían β -sitosterol,
456 estigmasterol, α - y β - amirinas, ácido *trans*-cinámico y escopoletina (García-Rodríguez et al.,
457 2012). Posteriormente, utilizando el modelo de inflamación de poliartritis inducido con ACF se
458 cuantificaron algunas citocinas pro- y antiinflamatorias características en un proceso de
459 inflamación crónica. Los resultados demostraron que el extracto inhibe los niveles séricos de las

Antecedentes

460 interleucinas (IL) IL-1 β en un 80 %, IL-6 en 44 % y en un 59 % se inhibieron los niveles de Factor
461 de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) analizado en el líquido sinovial. A su vez, se observó un
462 incremento de IL-10 sérica, lo que sugirió que el extracto diclorometano modula la respuesta a
463 nivel de citocinas pro- y antiinflamatorias (Juárez-Ciriaco et al., 2008).

464 El compuesto activo escopoletina administrada vía oral en ratas con artritis reumatoide inducida
465 con el ACF disminuyó de manera dosis-dependiente la inflamación articular y mejoró el estado
466 general del animal. La dosis de 100 mg/kg vía i.p. revirtió las alteraciones histopatológicas,
467 conservando la arquitectura histológica normal de las articulaciones debido a que fue capaz de
468 regular la sobreproducción de inductores angiogénicos endógenos como el factor de crecimiento
469 vascular, el factor de crecimiento de fibroblastos y la IL-6 en el tejido sinovial (Pan et al., 2009).
470 Estas actividades sustentan los efectos antiinflamatorios e inmunomodulador determinados en el
471 extracto diclorometano de tejidos aéreos de *S. angustifolia*. También se ha demostrado la actividad
472 de escopoletina como antioxidante (Jang et al 2020), antidiabética (Gwak et al., 2011),
473 antihipertensivo (Wigati., et al 2017; Aldi., et al 2015) y antiproliferativo (Thani., et al 2010) entre
474 otras.

475 Dentro de la vasta gama herbolaria *S. angustifolia* es una especie vegetal promisoría que cuenta
476 con la plataforma científica que sustenta el desarrollo de un fitomedicamento útil como
477 antiinflamatorio. La administración tópica de la formulación en gel elaborado con 1 % del extracto
478 diclorometano de *S. angustifolia* estandarizado en el contenido de escopoletina, mostró efectividad
479 terapéutica y tolerabilidad en pacientes con osteoartritis de mano, similar al observado en los
480 pacientes tratados con diclofenaco al 2 %. Los resultados demostraron que el gel de *S. angustifolia*
481 evaluado fue capaz de reducir los síntomas de la enfermedad como son el dolor, la inflamación y
482 la rigidez de las articulaciones. El efecto fue consistente y gradual promoviendo la capacidad del
483 movimiento de las manos en los pacientes (Romero-Cerecero et al., 2013).

484

485 **2.3 Producción de compuestos activos de *S. angustifolia* mediante el cultivo de células en** 486 **suspensión**

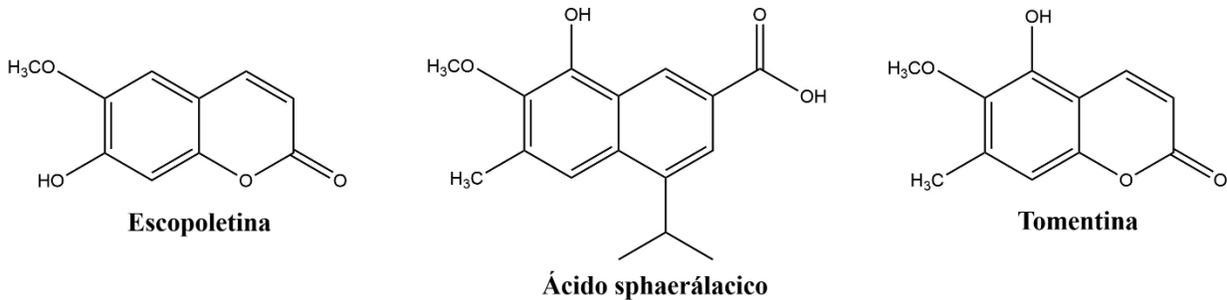
487 Los compuestos farmacéuticos de plantas pueden ser obtenidos con bajos rendimientos por
488 extracción directa de los tejidos donde se acumulan, corteza, tallo, hojas, etc., además, muchos
489 compuestos activos tienen estructuras químicas muy complejas difícil de obtener por síntesis

Antecedentes

490 química. El cultivo de células en suspensión de plantas es considerado una opción potencial para
491 la producción de compuestos activos, no obstante, solo pocos sistemas comerciales a gran escala
492 se han establecido debido a los bajos rendimientos de producción o a que las células pierden la
493 habilidad de producir estos compuestos (Caili and Meizhe 2021).

494 El primer reporte sobre la producción biotecnológica de compuestos activos a partir de cultivos de
495 células en suspensión de *S. angustifolia* es de Pérez-Hernández et al. (2014). El establecimiento
496 del cultivo de callos friables se logró a partir de explantes de hoja, usando diferentes
497 concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) en combinación con una sola concentración de
498 kinetina (Kin) en medio de Murashige y Skoog gelificado (MS, Murashige y Skoog 1962). Las
499 suspensiones celulares se establecieron a partir de 4 g de biomasa fresca como inóculo en 80 ml de
500 medio de cultivo MS líquido, con 1.0 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de Kin y 30 g/L de sacarosa. Esta
501 suspensión celular en medio de cultivo MS completo (27.4 mM de nitrato total) produjo
502 escopoletina (0.038 mg/g Pesos Seco (PS); Figura 2) y un nuevo compuesto denominado ácido
503 sphaerálcico (0.0144 mg/g PS; **Figura 2**). La escopoletina fue detectada solamente en el medio de
504 cultivo y el ácido sphaerálcico en el medio de cultivo e intracelularmente. Al disminuir diez veces
505 el contenido de nitrato total en el medio MS (2.74 mM) el desarrollo de la biomasa de la suspensión
506 celular no se modificó. La concentración de escopoletina detectada en células en suspensión
507 cultivadas en medio MS completo (0.038 mg/g PS) fue 5.7 veces mayor y en medio MS con 2.74
508 mM de nitratos (0.4 mg/g PS) fue 60 veces superior al detectado en la planta silvestre (0.0067 mg/g
509 PS). La suspensión celular cultivada bajo la restricción de nitratos produjo tomentina (0.96 mg/g
510 PS; Figura 2) y aumentó 2.5 veces el contenido de ácido sphaerálcico (0.036 mg/g PS; Pérez-
511 Hernández *et al.*, 2014; Nicasio-Torres et al., 2016). La mayor reducción de nitratos totales (0.274
512 mM) en el cultivo de las células en suspensión, únicamente estimuló la producción de ácido
513 sphaerálcico (0.067 mg/g PS), rendimiento que fue 4 veces superior al cultivado en medio MS sin
514 restricción de nitratos y 22 veces superior al contenido en planta silvestre (Nicasio-Torres et al.,
515 2016). La producción de estos compuestos mediante el cultivo de células en suspensión y
516 restricción de nitrato permitió aumentar los rendimientos en comparación con la planta silvestre,
517 sin embargo, estos rendimientos requieren ser optimizados proyectando su producción a mayor
518 escala (**Tabla 1**).

Antecedentes



519 **Figura 2.** Estructura química de compuestos antiinflamatorios producidos en células en suspensión de *S.*
 520 *angustifolia*.
 521

522 El cultivo de células en suspensión fue llevado a un escalamiento en biorreactor de tipo tanque
 523 agitado con 1.4 L de medio MS (2.74 mM de nitratos), suplementado con 1 mg/L de ANA y 0.1
 524 mg/L de Kin y 30 g/L de sacarosa. El biorreactor se manejó con una agitación de 200 rpm y un
 525 sistema de aireación de 0.1 volumen de aire/volumen de medio/min, obteniendo de esta manera un
 526 rendimiento de ácido sphaerálcico de 3.47 mg/g PS (Tabla 1; Pérez-Hernández et al., 2019a). La
 527 modificación de factores nutricionales ha sido una de las estrategias más eficaces adoptadas para
 528 aumentar la producción de compuestos fenólicos en cultivos de suspensión celular, como
 529 flavonoides, fenilpropanoides y cumarinas (Urbanczyk-Wochniak y Farnie 2005; Fritz et al. 2006),
 530 en el caso de las concentraciones de nitratos en medios de cultivo, es posible modular el crecimiento
 531 de la suspensión celular y el metabolismo secundario puede direccionarse para producir
 532 metabolitos ricos en carbono (Mora-Izquierdo et al., 2011; Nicasio-Torres et al., 2012, 2016).

533
 534 **Tabla 1** Rendimiento de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico reportados en cultivo de
 535 células en suspensión y planta silvestre de *S. angustifolia*.

Compuesto	Células en suspensión				Planta silvestre mg/g PS	Referencia
	mg/g PS (27.4 mM Nitratos)	Matraces mg/g PS (2.74 mM Nitratos)	mg/g PS (0.274 mM Nitratos)	Biorreactor mg/g PS (2.74 mM Nitratos)		
Escopoletina	0.038	0.4			0.0067	Pérez- Hernández <i>et al.</i> , 2014 Nicasio- Torres et al., 2016
Tomentina		0.96				
Ácido sphaerálcico	0.0144	0.036	0.067	3.47	0.003	

Antecedentes

537 **2.3.1 Actividad antiinflamatoria de extractos y compuestos presentes en cultivos celulares de** 538 ***S. angustifolia***

539 La actividad antinflamatoria (39 %) del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH (9:1) de la biomasa y CH₂Cl₂ del
540 medio de cultivo (42 %) de la suspensión celular de *S. angustifolia* cultivadas en medio MS
541 reducido en nitratos (2.74 mM), fue similar en el modelo de edema subplantar inducido con λ -
542 carragenina (100 mg/kg vía i.p.) en ratones. El efecto del extracto de la biomasa fue dosis
543 dependiente con una Dosis Efectiva media (DE₅₀) de 137.63 mg/kg. Posteriormente, en el modelo
544 de monoartritis experimental inducido con Caolín/ λ -Carragenina (C/C) se mostró que reduce la
545 inflamación (72 %) y ejerce un efecto inmunomodulador en la producción de las citocinas
546 proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) y antiinflamatorias (IL-4 e IL-10). Este mismo extracto no
547 mostró efectos tóxicos en la prueba de toxicidad por clases y fue seguro hasta la dosis de 2.0 g/kg
548 (Serrano-Román, 2015; Nicasio-Torres et al., 2017).

549 La actividad antiinflamatoria de ácido sphaerálcico y tomentina se determinó en los modelos de
550 edema subplantar inducido con λ -carragenina (45 mg/kg vía i.p.) en ratones y en el modelo de
551 edema auricular inducido por TPA (1 mg por oreja). El ácido sphaerálcico y tomentina presentaron
552 una actividad similar a la indometacina (medicamento antiinflamatorio) en la inhibición del edema
553 subplantar empleando la misma dosis. En la prueba de TPA, el ácido sphaerálcico fue el más activo
554 y presentó un efecto dosis dependiente con una DE₅₀ = 0.54 mg/oreja (Pérez-Hernández et al.,
555 2014). La actividad antiartrítica de tomentina y ácido sphaerálcico v.o. se evaluó en el modelo de
556 caolín/ λ -carragenina (C/C). Al día 9, el efecto antiinflamatorio de la administración oral resultó
557 dosis-dependiente para ambos compuestos, con una DE₅₀ 10.32 mg/kg/día para tomentina y DE₅₀
558 7.8 mg/kg/día para ácido sphaerálcico; a dosis de 20 mg/kg el ácido sphaerálcico inhibió el edema
559 al 100 %. La administración oral de ácido sphaerálcico y tomentina mostró un efecto
560 inmunomodulador sobre los niveles de las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y
561 antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) en las articulaciones (Serrano-Román, 2015; Nicasio-Torres et al.,
562 2017). El peso corporal promedio de los ratones disminuyó por el daño sistémico inducido por C/C,
563 este efecto no cambió en los ratones tratados con metotrexato. En los ratones con monoartritis
564 tratados con el extracto de diclorometano: metanol de biomasa celular de *S. angustifolia*, tomentina
565 y ácido sphaerálcico, la pérdida de peso corporal fue menor debido a la mejora fisiológica que
566 presentaban los ratones y por ende ingesta del alimento (Nicasio-Torres et al., 2017).

Antecedentes

567 **2.4 Cultivo de raíces transformadas**

568 Una estrategia biotecnológica que puede competir eficazmente con el cultivo de suspensiones
569 celulares son las raíces transformadas (pilosas) generadas por la infección con *Agrobacterium*
570 *rhizogenes* (*A. rhizogenes* una bacteria del suelo gram-negativa. Durante las últimas dos décadas,
571 la mayoría de los esfuerzos de investigación utilizando los cultivos de raíces pilosas se enfoca en
572 la investigación del metabolismo secundario. El rápido crecimiento en medios de cultivo libres de
573 hormonas, la estabilidad genética y bioquímica, el bajo tiempo de duplicación, las facilidades de
574 mantenimiento y la capacidad de sintetizar una gama de metabolitos secundarios, ofrecen una
575 ventaja adicional sobre los cultivos de células vegetales indiferenciadas (Chandra y Chandra,
576 2011).

577

578 **2.4.1 Metabolitos secundarios obtenidos mediante el cultivo de raíces transformadas**

579 Diversos cultivos de raíces pilosas de plantas medicinales se han establecido para la producción de
580 compuestos activos y compuestos *de novo* no identificados en las plantas que crecen en su hábitat
581 natural. Asimismo, se ha descrito que algunas vías biosintéticas que se expresan específicamente
582 en los tejidos aéreos de las plantas, como las hojas y los brotes, se expresan también en los cultivos
583 de raíces pilosas y permiten detectar la presencia de metabolitos secundarios que normalmente se
584 acumulan solo en tejidos aéreos de la planta. A continuación, se mencionan algunos reportes sobre
585 el cultivo de raíces pilosas empleado para la producción de metabolitos secundarios. Las raíces
586 pilosas de *Lawsonia inermis* crecidas en medio MS produjeron lawsona bajo condiciones de
587 oscuridad (Bakkali et al., 1997) y las de *Artemisia annua* produjeron artemisinina (Giri et al., 2001).
588 En el caso de las raíces transformadas de *Catharanthus roseus*, el contenido de alcaloides fue 2-3
589 veces superior que lo producido por raíces no transformadas; además, el contenido de alcaloides
590 fue estable durante más de 2 años tanto cuantitativa como cualitativamente (Wanget al., 2019).
591 Existen otros reportes en los cuales se demuestra que las raíces pilosas tienen una mayor
592 productividad de metabolitos secundarios comparado con la planta silvestre e incluso que otro tipo
593 de cultivos. Asimismo, el cultivo de raíces transformadas se ha utilizado para la producción de
594 cumarinas (**Tabla 2**), compuestos químicos a los que pertenecen la escopoletina y tomentina, en
595 donde se ha logrado aumentar la producción de estos compuestos en comparación con otros
596 cultivos.

Antecedentes

597 Existen reportes sobre cultivos de raíces pilosas de dos especies de la familia Malvacea a la cual
598 pertenece la especie *S. angustifolia*, *Gossypium hirsutum* L. y *Gossypium barbadense* L.
599 inoculando cotiledones y segmentos de hipocótilo con *A. rhizogenes* ATCC 15834. Para ambas
600 especies de *Gossypium*, las hojas cotiledonares mostraron más eventos de transformación que los
601 segmentos de hipocótilo; más de la mitad de los sitios de infección en los cotiledones de *G.*
602 *hirsutum* produjeron raíces pilosas, para *G. barbadense*, el porcentaje de sitios de infección que
603 resultó en la formación de raíz pilosa fue del 23.2 %. Después de 6 semanas en medio con
604 antibiótico, las puntas de las raíces pilosas se transfirieron a medio de cultivo líquido a pequeña
605 escala (15 ml) sin antibiótico; la transferencia a cultivo líquido estimuló el crecimiento. Después
606 de 3 semanas en cultivo líquido ambas especies de algodón produjeron gossipol, un metabolito
607 secundario sesquiterpénico con actividad anticancerígena conocida. El nivel promedio de gossipol
608 observado entre 96 cultivos diferentes fue 15 mg/g de masa seca y algunos cultivos produjeron >
609 40 mg/g de masa seca (Triplett et al., 2008).

610 Para la producción de compuestos activos en cultivos de raíces pilosas se deben considerar algunos
611 factores, como son la estabilidad de los compuestos, su toxicidad para el cultivo debido a las
612 grandes cantidades acumuladas, además del costo que implica su producción (Shi et al. 2021). La
613 estabilidad de las raíces pilosas con elevada producción de compuestos activos en cantidades
614 similares en cada subcultivo se logró después de muchos años de subcultivo continuo en las raíces
615 pilosas de *Hyoscyamus muticus* (16 años) y *Catharantus roseus* (11 años; Häkkinen et al. 2016;
616 Sun et al. 2017). Finalmente, para el cultivo a gran escala de raíces pilosas un biorreactor adecuado
617 podría ser otro factor limitante. Las raíces pilosas de *Panax ginseng* se cultivaron con éxito en un
618 biorreactor airlift de 19 L. y los de *Cichorium intybus* L. en el biorreactor de niebla acústica para
619 producir esculina, una cumarina con actividad antiinflamatoria (Bais et al. 2002; Stiles et al. 2013).
620 La acumulación de metabolitos secundarios puede incrementarse mediante diferentes elicitores
621 bióticos y abióticos (Caili y Meizhe 2021). Existen reportes del aumento en la producción de
622 umckalina, una cumarina de interés farmacológico, y fenoles simples (ácidos gálicos, vanílico y *p*-
623 cumárico) por efecto de la adición de metil jasmonato y sacarosa en cultivos de raíces pilosas de *P.*
624 *sidoides* (Yousefian et al., 2021). Otro reporte sobre cultivos de raíces pilosas de *Prunella vulgaris*
625 estimulados, indican que la adición de etefón incrementó 1.66 veces el contenido de ácido
626 rosmarínico 8 días después de su adición, y un incrementó 1.48 veces 2 días después de la adición
627 de ácido salicílico (Ru et al., 2016).

Antecedentes

628 Es importante mencionar que algunas empresas farmacéuticas (Mibelle, Sederma y Rootec)
629 utilizan esta tecnología para producir compuestos importantes para la salud: La empresa Rootec
630 produce atropina (medicamento anticolinérgico) a partir de raíces pilosas de *Atropa belladonna*,
631 nicotina (terapia de reemplazo de nicotina) de *Nicotiana glauca*, ginsenosidos (antioxidante,
632 anticancerígeno, para enfermedades cardiovasculares) de *Panax ginseng* y camptotecina
633 (anticancerígeno y antiviral) de *Camptotheca acuminata* (Ochoa-Villarreal et al. 2016).

634

Antecedentes

635 **Tabla 2.** Producción de compuestos activos en cultivos de raíces transformadas versus otros cultivos.
636

Especie	Compuesto	Actividad	Rendimientos mg/g PS	Rendimiento en otros cultivos mg/g PS	Referencia
<i>Gossypium barbadense</i>	Gosipol (Polifenol)	Anticancerígenas Antiviral Antimicrobiana Antifúngico	40	Raíces 17.4	Triplett et al., 2008
<i>Plumbago indica</i>	Plombagina (Naftoquinona)	Antitumoral	11.6	Plantas 5.7	Gangopadhyay et al., 2011
<i>Ruta graveolens L.</i>	Escopoletina (Cumarina)	Inmunomodulador Antiinflamatorio	0.123	Brotes ND	Sidwa-Gorycka et al., 2009
	Rutacultina (Cumarina)	Antimicrobiana Antiinflamatoria	0.269	Brotes 0.136	
	Pinnarina (Cumarina)		0.137	Brotes 0.028	
	Bergapteno (Furanocumarina)	Antiinflamatoria Antimicrobiana Anticonvulsiva	1.01	Brotes 0.41	
	Isopimpineline (Furanocumarina)	Antifúngica	1.06	Brotes 0.056	
	Xantotoxina (Furanoumarina)	Antitumoral Antiinflamatoria Anticonvulsiva	0.41	Brotes 0.338	
	Rutamarina (Dihidro-furanocumarina)	Antiviral Antiespasmogénico	0.33	Brotes 0.224	
<i>Vitis vinifera</i>	Resveratrol (Polifenol)	Vasorelajante Antioxidante	2.7×10^{-4}	Raíces T 9×10^{-6}	Hosseini, 2017
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Tanshinonas	Anticancerígeno Antiinflamatorio Antioxidante	0.931	Planta 1.6×10^{-4}	Kai et al., 2012
<i>Ammi majus</i>	Umbelliferona (Cumarina)	Antioxidante Antimicrobiano Antihiper glucémico	19	Células en Suspensión 1	Staniszewska et al., 2003

637

Antecedentes

638 **2.4.2 Generación de raíces pilosas**

639 La raíz pilosa y el tumor de agalla de corona son dos enfermedades de las plantas causadas por dos
640 bacterias del suelo Gramnegativas, *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens*, respectivamente. En los
641 plásmidos de las cepas de *A. tumefaciens* (Ti, inductor tumoral) y de *A. rhizogenes* (Ri, inductor
642 de raíz) las secuencias invertidas (25 pb) en los extremos 5' y 3' denominadas borde izquierdo y
643 derecho (TL y TR) delimitan la secuencia de ADN que se transfiere (ADN-T) a la célula vegetal.
644 El ADN-T transferido permite que las células vegetales proliferen para formar tumores o agallas
645 en la corona, y en el caso del plásmido Ri, la extensa formación de raíces adventicias en el sitio de
646 infección o cerca del mismo. Los tejidos vegetales transformados también son dirigidos por genes
647 dentro del ADN-T para producir metabolitos inusuales llamados opinas, que sirven como nutrientes
648 específicos para las bacterias (Sevón et al., 2002).

649 El mecanismo molecular de la transferencia del ADN-T a la planta es probablemente el mismo
650 para ambas especies de *Agrobacterium*, no obstante, la base fisiológica de la tumorogénesis es
651 diferente. Los tumores resultan de la sobreproducción de las fitohormonas auxinas y citoquininas
652 especificadas por los genes del ADN-TL de *A. tumefaciens* (Gelvin, 1990). La base fisiológica de
653 la enfermedad de la raíz pilosa no está totalmente comprendida, se alude que la alteración del
654 metabolismo de la auxina en las células transformadas desempeña un papel importante en la
655 expresión del fenotipo de la raíz pilosa (Gelvin, 2000; Palazón *et al.*, 1997) pero no tiene injerencia
656 en la expresión del ADN-T en las células vegetales transformadas (Bahramnejad, et al., 2019). Los
657 estudios fisiológicos han demostrado que algunos de los genes del ADN-TL les confieren a las
658 células transformadas mayor sensibilidad a las auxinas suministradas extracelularmente
659 (Bahramnejad, et al., 2019).

660

661 **2.4.3 Mecanismo de la interacción entre células de plantas y *Agrobacterium***

662 Una de las primeras etapas en la interacción entre *Agrobacterium* y una planta es la unión de la
663 bacteria a la superficie de la célula de la planta. La célula vegetal se vuelve susceptible a
664 *Agrobacterium* cuando presenta una lesión provocando la liberación de compuestos fenólicos,
665 como la acetosiringona, la cual activa la región *vir* del plásmido bacteriano (Binns, 1988). Se ha
666 demostrado que el plásmido de *Agrobacterium* contiene tres componentes genéticos necesarios
667 para la transformación de células vegetales. El primer componente, el ADN-T que se inserta en el

Antecedentes

668 genoma en las células vegetales, es un elemento de ADN móvil. El segundo es el área de virulencia
669 (*vir*), que contiene varios genes *vir*, estos genes no se transfieren a la célula de la planta, sino que,
670 junto con el ADN cromosómico (dos loci) promueven la transferencia del ADN-T. El tercer
671 componente, las llamadas secuencias repetidas de borde (25 pb) reside en el plásmido Ti/Ri de
672 *Agrobacterium*. La movilidad del ADN-T está determinada en gran parte por estas secuencias y
673 son los únicos elementos *cis* necesarios para su procesamiento (Gelvin, 2000).

674 La transferencia de ADN-T de la bacteria a la célula de la planta es un proceso que involucra
675 actividades de recombinación, repetición y reparación, muy probablemente mediadas por enzimas
676 de la célula hospedera. El proceso general de integración es probablemente muy similar a cualquier
677 recombinación ilegítima de ADN extraño en genomas eucariotas (Zupan y Zambryski, 1995;
678 Tinland, 1996; Gelvin, 2000).

679

680 **2.4.4 Caracterización de los plásmidos de *A. rhizogenes***

681 Los plásmidos son grandes (200 a más de 800 kb) y contienen una o dos regiones de ADN-T y una
682 región Vir (virulencia) necesarios para la formación de raíces (Gelvin, 1990). La clasificación de
683 los plásmidos Ri se basa en el tipo de opinas sintetizadas en las células vegetales transformadas
684 por *A. rhizogenes*. Las cepas de tipo agropina (A4, 15834, LBA9402, 1855) inducen raíces para
685 sintetizar agropina y manopina, y las cepas de tipo manopina (8196, TR7, TR101) inducen raíces
686 para producir solo manopina. Los plásmidos Ri de tipo agropina son muy similares como grupo y
687 distinto de los plásmidos de tipo manopina. Los plásmidos Ri más estudiados son los de cepas de
688 tipo agropina, consideradas las más virulentas y por lo tanto más utilizadas en el establecimiento
689 de cultivos de raíces pilosas. El uso de *Agrobacterium* como vector se basa en su capacidad única
690 de transferir una parte de su propio ADN (ADN-T) al genoma nuclear de las células vegetales.
691 Cualquier ADN colocado entre los bordes será transferido a una célula vegetal, esta propiedad ha
692 sido extremadamente útil para la introducción de nuevos genes en las plantas, ya sea para
693 investigación o para aplicaciones prácticas (Tinland, 1996).

694

695 **2.4.4 Genes implicados en la formación de raíz pilosa**

696 Los genes responsables de la formación de la raíz pilosa se encuentran en el ADN-T del plásmido
697 Ri que consta de dos regiones de ADN-T separadas, el ADN-TL y el ADN-TR (White et al., 1985).

Antecedentes

698 Cada uno de los fragmentos de ADN-T abarca una región de 15 - 20 kb separados entre sí por al
699 menos 15 kb de ADN de plásmido no integrado y los dos fragmentos se pueden transferir de forma
700 independiente durante el proceso de infección. El ADN-T del plásmido Ri de tipo agropina tiene
701 una homología de secuencia limitada con las secuencias de ADN-T del plásmido Ti de tipo
702 nopalina u octopina, y comparte homología solo en la región correspondiente a dos loci que
703 codifican la síntesis de auxina y los loci de síntesis de agropina. No se ha reportado homología
704 entre el ADN-T del plásmido Ri y el locus *tmr* del ADN-T del plásmido Ti. Los genes que codifican
705 la síntesis de auxina (*tms1* y *tms2*) y la síntesis de agropina (*ags*) se han localizado en el ADN-TR
706 del plásmido Ri de tipo agropina. Los plásmidos Ri de tipo manopina contienen solo un ADN-T
707 que comparte una homología de secuencia de ADN considerable con la TL de los plásmidos de
708 tipo agropina (Gelvin, 1990; White et al., 1985; Vilaine et al., 1987).

709 Con el análisis de mutaciones del ADN-TL se identificaron cuatro loci genéticos designados como
710 locus *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD* que promueven la inducción de raíces pilosas. La secuencia completa
711 de los nucleótidos de la región TL reveló la presencia de 18 marcos de lectura abierta (OFR), 4 de
712 los cuales, ORF 10, 11, 12 y 15 respectivamente, corresponden a loci *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD*.
713 También se demostró que *rolA*, *rolB* y *rolC* desempeñan el papel más importante en la iniciación
714 de raíces pilosas; en particular, *rolB* parece ser crucial en el proceso de diferenciación de las células
715 transformadas. Aunque el ADN-TR no es esencial para la formación de raíz pilosa, se ha
716 demostrado que el gen *aux1* albergado en este segmento proporciona a las células transformadas
717 una fuente adicional de auxina para la formación de raíces pilosas (Gelvin, 1990; Sarkar et al.,
718 2018).

719 El gen *rolA* se encontró en todos los plásmidos Ri conocidos cuyo extremo N-terminal está
720 altamente conservado entre diferentes cepas, mientras que el C-terminal varía considerablemente.
721 Se trata de una proteína con una masa molecular pequeña (11.4 kDa) y un alto punto isoeléctrico
722 (11.2). Estas características sugieren que *rolA* puede interactuar con los ácidos nucleicos y estar
723 implicado en la regulación de la expresión génica en plantas (Sarkar et al., 2018). Además, la
724 expresión de *rolA* reduce la síntesis de ciertas hormonas como auxina, citocinina, giberelina, ácido
725 abscísico y etileno (Sarkar et al., 2018). El análisis de eliminación de la región promotora reveló la
726 presencia de tres dominios funcionales (A, B, C: -638...-477 pb, -473...-366 pb y -200...-366
727 pb respectivamente (Guivarc'h et al., 1996).

Antecedentes

728 Estudios sobre la transformación de las plantas a través de la inactivación de los oncogenes, mostró
729 que la transformación por el gen *rolB* activado indujo un fenotipo de raíz pilosa agravitrópica con
730 un crecimiento acelerado y ramificación; por ello se pensó que el gen *rolB* desempeñaba un papel
731 fundamental en el enraizamiento (Mauro y Bettini, 2021). Sin embargo, el papel del gen *rolB* no
732 se limita a la formación de raíces, ya que en la literatura se describieron ejemplos de otros cambios
733 morfológicos derivados de la transformación de plantas con vectores que contienen el gen *rolB*. En
734 experimentos sobre tejidos aislados obtenidos de plantas y pedúnculos transformados por el gen
735 *rolB*, se demostró que afecta la formación de varios tipos de meristemos y un tipo específico de
736 diferenciación está determinado por el equilibrio hormonal del tejido original (Sarkar et al., 2018).
737 Además, *rolB*, así como *rolC*, es un potente inductor de cambios del metabolismo secundario en
738 plantas transgénicas (Shkryl et al., 2008). A nivel celular, *rolB* probablemente altera su sensibilidad
739 a la auxina, es posible que *rolB* estimule la producción de proteínas de unión a auxina o aumente
740 su actividad (Mauro y Bettini, 2021).

741 La proteína RolC de la cepa pRi A4 tiene actividad β -glucolítica y es capaz de liberar citocininas
742 activas de conjugados con N- y O-glucósidos; además, *rolC* fue capaz de escindir N-glucósidos
743 resistentes a otras glicosidasas celulares. Los transformantes *rolC* (*rolC* bajo promotor
744 constitutivo) presenta un mayor contenido de citocininas libres. La proteína RolC se localiza en el
745 citoplasma y las citocininas asociadas a glucósidos se localizan en las vacuolas; probablemente,
746 RolC escindió glucósidos exógenos antes de que fueran secuestrados en las vacuolas (Estruch et
747 al., 1991). El fenotipo de las plantas transgénicas por *rolC* no depende de la capacidad de la proteína
748 RolC para liberar citocininas de los conjugados (Estruch et al., 1996). La sacarosa puede estimular
749 la formación de raíces de crecimiento debido a que en la región promotora *rolC* hay un elemento
750 regulador *cis* activado por sacarosa (ubicado en las proximidades de -13... -94 del punto de
751 iniciación de la transcripción), por lo tanto, la sacarosa puede actuar como una molécula de
752 señalización que induce la expresión de *rolC* en el sistema vascular (Mohajjel-Shoja et al., 2011;).

753 El gen *rolD*, a diferencia de otros genes *rol*, no se detectó en todas las cepas de *A. rhizogenes*. El
754 efecto principal del *rolD* es la formación de meristemos post-embionario, en particular la
755 formación de yemas axilares, así como una floración más temprana y abundante (Trovato et al.,
756 2018). En plantas transgénicas, la expresión de *rolD* está vinculada a todos los tejidos diferenciados
757 en crecimiento como cotiledones, hojas y partes de una flor; el nivel de expresión depende de la

Antecedentes

758 edad del tejido, el máximo nivel se presenta en tejidos adultos y disminuye con el envejecimiento
759 (Altamura, 2004).

760 El análisis de la secuencia de nucleótidos demostró que *rolD* tiene homología de secuencia con la
761 ornitina ciclodesaminasa, participa en la conversión dependiente de NAD⁺ de L-ornitina en L-
762 prolina (Trovato et al., 2001). La ornitina ciclodeaminasa se encontró en *A. tumefaciens*, está
763 implicado en el catabolismo de la inopina y en la síntesis de la arginina en las células tumorales.
764 Además, la ornitina ciclodeaminasa está codificada fuera del ADN-T, es decir, en la parte del
765 plásmido Ti que no se transfiere al genoma de la planta durante la transformación (Schindler et al.,
766 1989). Es interesante observar que en la especie estrechamente relacionada *A. rhizogenes*, la
767 secuencia de la ornitina ciclodeaminasa es parte del ADN-T y la bacteria no la usa para el
768 catabolismo de la opina, pero tiene motivos *cis* reguladores eucarióticos por los cuales un gen de
769 ornitina ciclodeaminasa puede expresarse solo en células vegetales. Además, como en *rolB*, *rolD*
770 tiene un promotor regulado por auxinas, el dominio Dof se detectó en este promotor (Altamura,
771 2004).

772

773 **2.4.5 Formación de células indiferenciadas por la infección de *A. rhizogenes***

774 Moyano y col. (1999) demostraron que la inoculación de secciones de hojas de plantas de *Nicotiana*
775 *tabacum*, *Datura metel* y un híbrido de *Duboisia* con la cepa A4 de *A. rhizogenes*, indujo raíces
776 transformadas con capacidad para producir alcaloides como nicotina, hiosciamina y escopolamina.
777 Las raíces obtenidas mostraron morfologías como de raíces pilosas típicas con alta capacidad de
778 producir alcaloides y raíces callosas con crecimiento más rápido y menor producción de alcaloides.
779 El gen *auxI* localizado en el ADN-TR de *A. rhizogenes* se detectó en todas las raíces que mostraban
780 una morfología similar a un callo y solo se detectó en el 25-60 % de los cultivos de raíces
781 establecidos que mostraban una morfología pilosa típica. Estos estudios demostraron un papel
782 significativo de los genes *aux* en la morfología de las raíces transformadas y la importancia de la
783 morfología típica de la raíz pilosa en la producción de escopolamina. Los estudios con raíces
784 pilosas de *Panax ginseng* también apoyaron los efectos de los genes ubicados en el ADN-TR sobre
785 la morfología de la raíz y el metabolismo secundario (Mallol et al. 2001). El gen ORF13 se expresa
786 en respuesta a una herida estimulando la formación de callos y previniendo la diferenciación de las
787 células (Hansen et al. 1997).

Antecedentes

788 De los genes *rol*, *rolB* es aparentemente el inductor más eficaz del metabolismo secundario y
789 también el supresor más poderoso del crecimiento celular. En los callos transformados de *Rubia*
790 *cordifolia*, la expresión de *rolB* se correlacionó positivamente con el aumento de la expresión del
791 gen que codifica a la enzima isocorismato sintasa (ICS), enzima clave en la biosíntesis de
792 antraquinonas (Shkryl et al. 2008). Los niveles altos de expresión del gen *rolB* se correlacionaron
793 con la inhibición del crecimiento de estos callos de una manera dependiente; en tanto que, los genes
794 *rolA* y *rolC* no afectaron el crecimiento de los callos (Shkryl et al. 2008).

795 El gen *rolC* es capaz de estimular la producción de alcaloides tropano (Bonhomme et al. 2000),
796 alcaloides piridínicos (Moyano et al., 2002), alcaloides indólicos (Palazón et al. 1998),
797 ginsenósidos (Bulgakov et al., 1998) y antraquinonas (Bulgakov et al. 2002; Shkryl et al. 2008) en
798 plantas transformadas y cultivos de células vegetales. En callos transformados de *R. cordifolia*, la
799 expresión de *rolC* condujo a un aumento estable del contenido de antraquinona. El grado de
800 expresión del gen ICS fue de 1.3 a 1.8 veces mayor que el de las células no transformadas
801 (Bulgakov et al., 2002). Después de períodos prolongados de cultivo (más de 5 años), los callos
802 transformados con *rolC* de *R. cordifolia* acumularon de 2.0 a 4.3 veces más antraquinonas que los
803 callos no transformados, lo que demuestra que el aumento en la productividad adquirido es estable
804 a lo largo del tiempo (Shkryl et al. 2008). La producción de antraquinonas y la expresión del gen
805 ICS dependían de la expresión de *rolC*. a mayor expresión del gen *rolC* mayor expresión del gen
806 ICS y con ello la acumulación de antraquinonas (Shkryl et al. 2008).

807

808

Antecedentes

809 **2.5 Incidencia de úlcera péptica en México**

810 Las úlceras pépticas (UP) afectan a un promedio de 14.5 millones de personas con rango de
811 mortalidad de 4.08 millones (Murray, 2013). En México, la Secretaría de Salud reportó en el año
812 2005 que las UP estaban en el 15° lugar como causa de muerte en personas mayores de 65 años
813 (0.8 %) con un total de 2,209 defunciones (Raña et al., 2009).

814 Un total de 1,596,641 casos de enfermedades no transmisibles (ENT) se reportaron de enero a junio
815 del año 2021, a través del Sistema Único Automatizado para la Vigilancia Epidemiológica
816 (SUAVE) enlistadas en el Apéndice informativo B de la Norma Oficial Mexicana NOM-017-
817 SSA2. El mayor porcentaje de notificación de ENT correspondió a casos de úlceras, gastritis y
818 duodenitis (28.2 %), seguidos por los casos de hipertensión arterial (15.4 %) y obesidad (14.8 %)
819 De acuerdo con los registros del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en
820 ese mismo año, la tasa nacional de incidencia de úlcera, gastritis y duodenitis fue de 349 casos por
821 cada 100 mil habitantes; los casos de esta enfermedad tuvieron mayor incidencia en el sexo
822 femenino, la tasa de incidencia por grupo de edad en mujeres fue de 790 casos por cada 100 mil
823 habitantes en el grupo de 45 a 49 años y de 607.1 en el grupo 60 a 64 años en el sexo masculino
824 (SERETARIA DE SALUD, 2021).

825

826 **2.5.1 Inflamación y daño gástrico por úlceras**

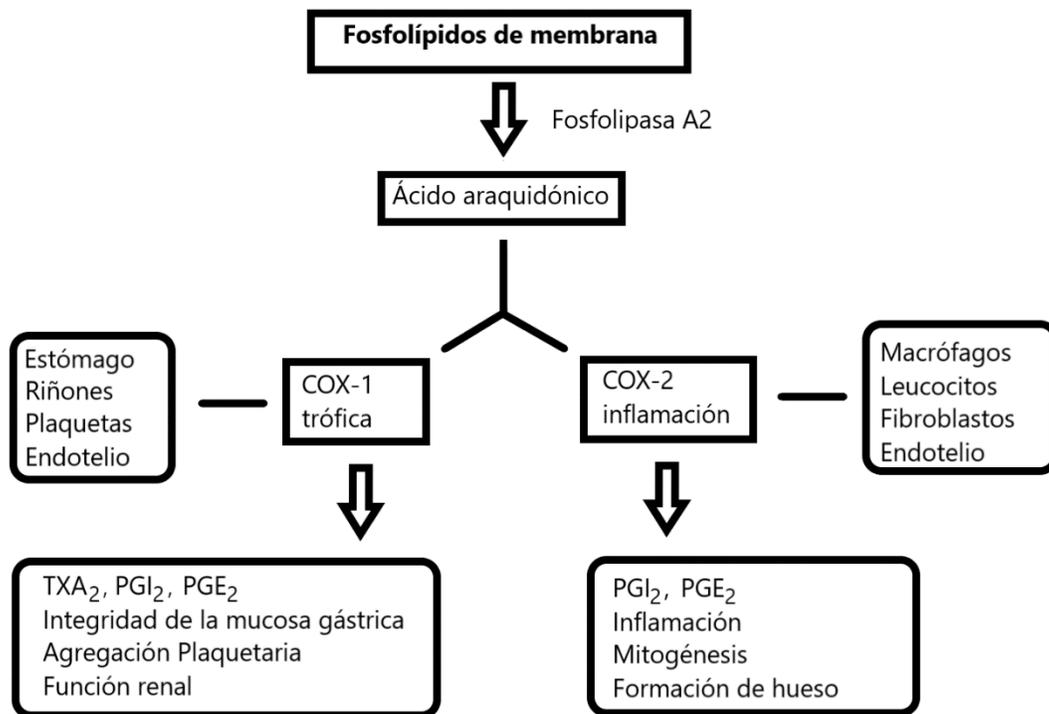
827 Las UPs se reconocen como el problema más común del tracto gastrointestinal caracterizadas por
828 la pérdida de la integridad de la mucosa del estómago (úlcera gástrica [UG]) o duodeno (úlcera
829 duodenal [UD]) a causa de un proceso de inflamación continua (Del Valle, 2016).

830 La mucosa gástrica tiene una función central en el sistema de defensa y reparación del epitelio
831 gástrico (**Figura 3**). A través de las prostaglandinas regulan la liberación de bicarbonato y moco
832 en la mucosa gástrica, inhiben la secreción de las células parietales y son importantes en el
833 mantenimiento del flujo sanguíneo mucoso y la restitución celular epitelial. La biosíntesis de
834 prostaglandinas a partir del ácido araquidónico es catalizada por las isoenzimas ciclooxigenasas
835 (COX): la COX-1 o isoforma constitutiva y la COX-2 o isoforma inducible. La COX-1 está
836 presente en la mayoría de las células, incluidas las células endoteliales, el epitelio gastrointestinal
837 y las plaquetas; en estos tejidos, COX 1 regula la síntesis de prostaglandinas que participan en el

Antecedentes

838 mantenimiento de las funciones fisiológicas básicas como la secreción de moco en el estómago.
839 Esta isoforma tiene una función importante en la preservación de la integridad de la función renal,
840 la agregación plaquetaria y la integridad de la mucosa del tubo digestivo. En tanto que la COX-2
841 está presente en pocos tejidos y está involucrada en el proceso de inflamación en macrófagos,
842 leucocitos, fibroblastos y células sinoviales (Carrion, 2000).

843



844

845 **Figura 3.** Representación esquemática de la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂) y prostaciclina (PGI₂).
846 Se muestra también las características de y la distribución de las enzimas ciclooxigenasa (COX) 1 y 2.
847 Tomado y editado de Harrison, Principios de Medicina Interna 19ª edición (2016).

848

849 Las UG que aparecen en el área prepilórica o las del cuerpo relacionadas con la úlcera duodenal
850 tienen una patogenia similar. La secreción de ácido gástrico (basal y estimulado) es normal o
851 disminuye en los pacientes con UG. Cuando ésta aparece en presencia de concentraciones mínimas
852 de ácido existe una alteración de los factores de defensa preepiteliales (moco, bicarbonato o
853 fosfolípidos).

854 Las UG se clasifican según su ubicación: las de tipo I aparecen en el cuerpo gástrico y se
855 acompañan a menudo de una producción reducida de ácido gástrico; las de tipo II aparecen en el

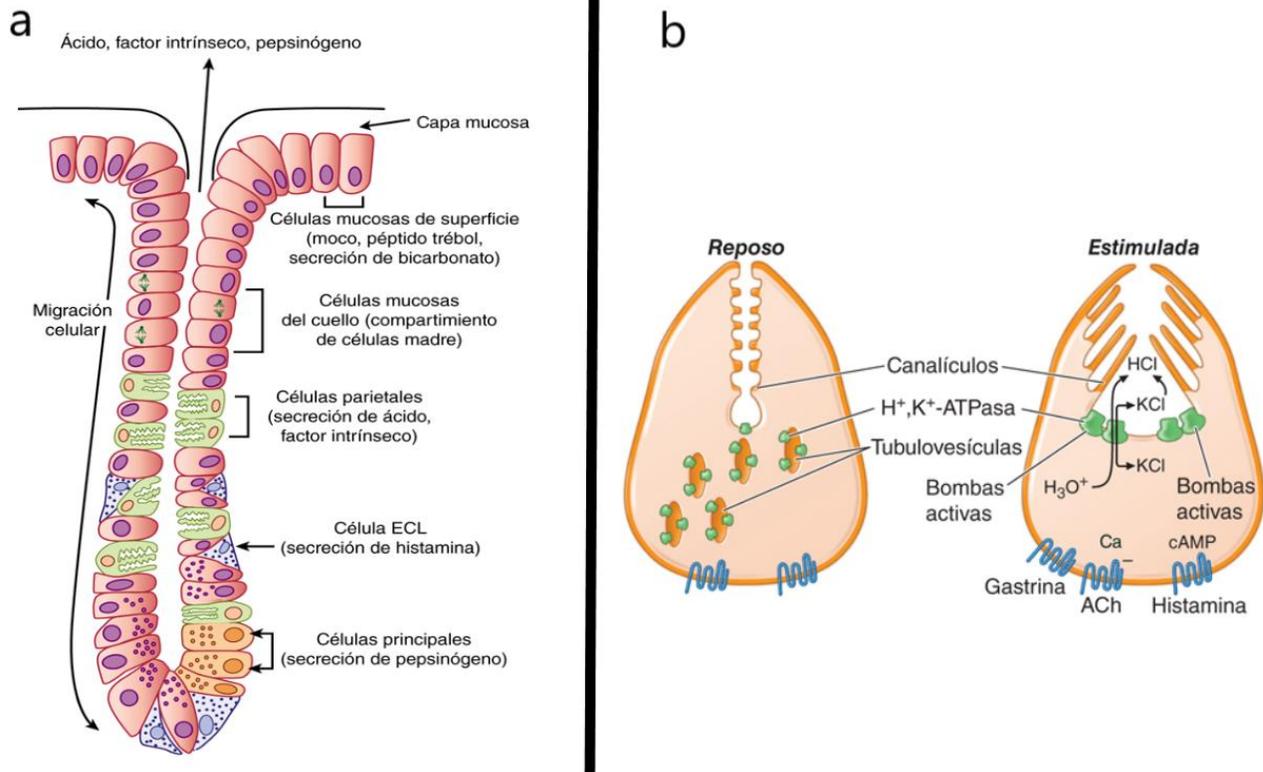
Antecedentes

856 antro y la cantidad de ácido gástrico es reducida o normal; las de tipo III aparecen a 3 cm del píloro
857 y suelen acompañarse de UD y una producción normal o excesiva de ácido gástrico; asimismo, las
858 de tipo IV surgen en el Cardis y se vinculan con hipoproducción de ácido gástrico (Del Valle,
859 2016).

860 El ácido gástrico y el pepsinógeno secretadas en el estómago pueden lesionar la mucosa. Las
861 células parietales del estómago producen ácido gástrico, tanto en reposo como por la ingesta de
862 alimentos (**Figura 4a**), así como por estímulos colinérgicos a través del nervio vago y los estímulos
863 histaminérgicos de origen gástrico circunscrito (**Figura 4b**). El estímulo de secreción de ácido
864 gástrico tiene tres fases, según sea el sitio donde se origina la señal (cefálica, gástrica e intestinal).
865 1) La vista, el olfato y el gusto de los alimentos constituyen los componentes de la parte cefálica,
866 que estimula la secreción gástrica a través del nervio vago. 2) La fase gástrica se activa por algunos
867 nutrientes (aminoácidos y aminos) una vez que el alimento penetra en el estómago, a su vez, el
868 ácido gástrico secretado activa de forma directa a las células G y estas activan a las células
869 parietales a través de mecanismos directos e indirectos. La última fase de la secreción de ácido
870 gástrico empieza cuando el alimento penetra en el intestino, dicha fase se halla bajo regulación de
871 la distensión de la luz y la asimilación de nutrientes (Schubert y Peura., 2004; Del Valle, 2016).
872 Las células endocrinas de la mucosa gástrica (células D) producen la hormona digestiva somatostatina
873 en respuesta al ácido gástrico, inhibiendo con ello su secreción por un mecanismo directo (células
874 parietales) e indirecto (menor liberación de histamina desde la célula semejantes a las
875 enterocromafines [ECL enterochromaffin-like]), a través de la producción de gastrina por las
876 células G. Otros factores, nerviosos (centrales y periféricos) y humorales (amilina, péptido
877 natriurético auricular, colecistocinina, grelina, IL-11, obestatina, secretina y serotonina) también
878 participan para contrarrestar la secreción de ácido (Del Valle, 2016).

879

Antecedentes

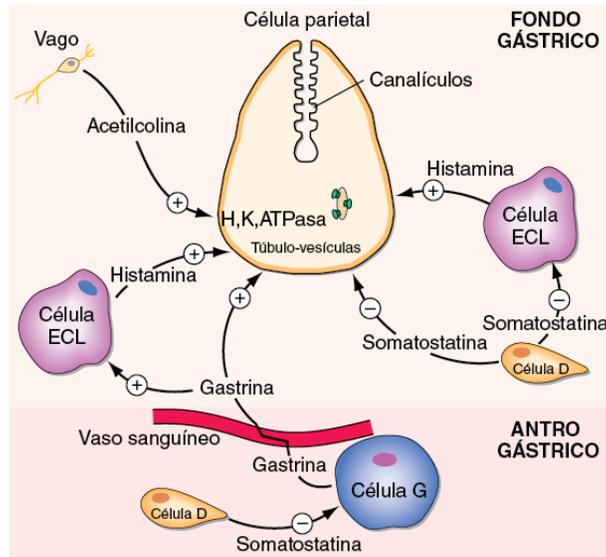


880
881 **Figura 4.** Representación esquemática de la glándula oxíntica gástrica **a**) y célula parietal gástrica **b**). Célula
882 semejante a las enterocromafines (ECL), acetilcolina (ACh), monofosfato de adenosina cíclico (cAMP).
883 Tomado de Harrison, Principios de Medicina Interna 19^a edición (2016).

884
885 La célula parietal expresa receptores para diversos estímulos de la secreción de ácido (**Figura 5**),
886 incluidos histamina (H₂), gastrina (colecistocinina B y receptor de gastrina) y acetilcolina
887 (muscarínico, M₃). La unión de la histamina con el receptor de H₂ activa a la adenilatociclasa y
888 aumenta el monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). La activación del la gastrina y los receptores
889 muscarínicos tiene como resultado la activación de la vía de señales de la proteína cinasa
890 C/fosfoinositósido. A su vez, cada una de estas vías de señales regula una serie de secuencias
891 desencadenantes de cinasas que regulan a la bomba secretora de ácido H⁺, K⁺-ATPasa la cual
892 produce una elevada concentración de H⁺. Se trata de una proteína unida a membrana compuesta
893 por 2 subunidades, α y β. Esta enzima utiliza energía química del trifosfato de adenosina (ATP)
894 para transferir iones H⁺ del citoplasma de las células parietales a los canalículos secretores e
895 intercambiarlos por K⁺. Las bombas de protones se reciclan a la fase inactiva en las vesículas
896 citoplásmicas una vez que cesa la activación de las células parietales (Del Valle, 2016).

897

Antecedentes



898

899 **Figura 5.** Posibles mecanismos por los cuales se puede producir alteraciones en la secreción gástrica.
900 Tomado y modificado de Harrison, Principios de Medicina Interna. 19ª edición (2016).

901

902 2.5.2 Úlceras producidas por fármacos antiinflamatorios no esteroideos

903 En la actualidad la úlcera gástrica se asocia en un 50-70 % de los casos con presencia de
904 *Helicobacter pylori*, y en un 24 % por ingesta de fármacos antiinflamatorios no esteroideos
905 (AINES); en tanto que, el 95 % de las úlceras duodenales se asocian con infección por *H. pylori*
906 (Watanabe et al., 2001; Hernández et al., 2008). Estudios en animales han demostrado que la
907 adherencia de neutrófilos a la microcirculación gástrica desempeña una función esencial en el
908 inicio de la lesión de la mucosa iniciada por AINES. La lesión de la mucosa caracterizada por
909 hemorragia submucosa y erosiones es resultado del encuentro tóxico con los AINES. Muchos de
910 estos últimos y el ácido acetilsalicílico son ácidos débiles que permanecen en una forma lipófila
911 no ionizada en el ambiente gástrico. En estas circunstancias, los AINES se desplazan a través de
912 las membranas lipídicas de las células epiteliales y lesionan a la célula una vez que quedan
913 atrapados en su interior en forma ionizada. Asimismo, tales fármacos tópicos alteran la superficie
914 mucosa, lo que posibilita la retro difusión de H^+ y pepsina, con lo cual se daña aún más la célula
915 epitelial. Además, las preparaciones amortiguadoras o con capa entérica también tienen riesgo de
916 producir UP (Del Valle, 2016).

917 El efecto antiinflamatorio de los AINES está mediado por la inhibición de la COX-1, enzima que
918 regula la síntesis endógena de prostaglandinas, provocando la erosión superficial de la mucosa

Antecedentes

919 gastroduodenal. De esta manera un AINE será más gastro-lesivo cuanto más inhiba la COX-1; por
920 tanto, el índice COX-2/COX-1 será más alto, por lo contrario, un AINE será mejor tolerado a nivel
921 gastrointestinal cuanto menos inhiba la COX-1, con lo que su índice COX-2/COX-1 será más bajo
922 (Carrion, 2000; Domingo, 2002; Ricciotti y FitzGerald, 2011).

923

924 **2.5.3 Úlceras producidas por etanol**

925 La investigación de los mecanismos endógenos de gastroprotección es de utilidad en el desarrollo
926 de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la úlcera péptica. La administración oral de
927 etanol es un método de inducción de daño gástrico. La administración de etanol al 25 % reduce la
928 secreción de moco e incrementa la secreción de ácido gástrico (Kang et al., 1995). La
929 administración de etanol al 50 % causa daño por la constricción de las vénulas (Saeki et al., 2004)
930 y la reducción del flujo sanguíneo gástrico produce necrosis en la mucosa y daño gástrico extenso
931 en un periodo de tiempo corto (Bou-Abboud et al., 1988). El etanol absoluto induce cambios
932 histopatológicos severos en la mucosa de estómagos de rata y ratón, que consisten en agudas
933 lesiones erosivas hemorrágicas, acompañadas de congestión vascular, edema y necrosis (Al-
934 Shabanah et al., 2000; Gazzieri et al., 2007). Además, el etanol absoluto disminuye los niveles
935 gástricos de proteínas, ácidos nucleicos, grupos sulfhidrilos no proteicos y sustancias antioxidantes
936 (Zamora-Rodríguez et al., 2007); también incrementa el contenido de radicales libres debido a la
937 estimulación de la lipoperoxidación, impacta en los niveles de los mediadores de gastroprotección
938 endógenos como el óxido nítrico, prostaglandinas y sulfuro de hidrógeno, lo cual contribuye al
939 desarrollo del daño gástrico (Al-Shabanah et al., 2000; Chávez-Piña y Navarrete, 2009).

940 El ácido gástrico y los radicales libres generados a partir de la xantina oxidasa (Mutoh et al., 1990)
941 y los neutrófilos (Tepperman y Soper, 1990) en la mucosa gástrica, juegan un papel importante en
942 la patogénesis de las lesiones gástricas agudas inducida por etanol. Los radicales libres importantes
943 en la producción de lesiones gástricas agudas conocidos son los superóxidos, hidroxilo, ácido
944 hipocloroso (HOCl), y un compuesto de peroxinitrito formado en presencia de óxido nítrico en
945 exceso generado por la enzima óxido nítrico sintasa inducida (iNOS) y el radical superóxido
946 (Mahattanadul et al., 2011).

Antecedentes

947 **2.5.4 Cumarinas con actividad gastroprotectora**

948 Las cumarinas tienen múltiples actividades biológicas, afectan la formación y el secuestro de
949 especies reactivas de oxígeno (ROS) y los procesos que involucra la lesión mediada por los
950 radicales libres. Las cumarinas pueden reducir la inflamación, por ejemplo, la cumarina y su
951 derivado 7-hidroxi inhiben la biosíntesis de prostaglandinas (Fylaktakidou et al., 2004); esculetina,
952 fraxetina, dafhnetina, escopoletina y otros derivados de cumarinas son reconocidos como
953 inhibidores enzimáticos de la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa, también de la generación de aniones
954 superóxido dependientes de neutrófilos (Fylaktakidou et al., 2004).

955 En el modelo de úlceras gástricas inducidas por etanol al 80 %, se determinó que la escopoletina
956 (1 mg/kg) inhibió la formación de úlceras en un 82.25 % y en un 81.42 % en el modelo de úlceras
957 inducido por serotonina. La escopoletina elimina radicales libres de oxígeno, compuestos
958 peroxinitritos y controla los niveles de serotonina; además, se especuló que la escopoletina puede
959 reducir la secreción de ácido gástrico a través de la supresión de H^+/K^+ -ATPasa (Mahattanadul et
960 al., 2011).

961 **3. Justificación**

962 Los estudios que sustentan la efectividad antiinflamatoria e inmunomoduladora de tejidos aéreos
963 de la especie *Sphaeralcea angustifolia*, dejaron clara la necesidad de desarrollar métodos
964 biotecnológicos viables que permitan obtener tejidos vegetales *in vitro* productores de los
965 metabolitos activos, tomentina escopoletina y ácido sphaerálcico, estos dos últimos son dos
966 potentes antiinflamatorios detectados en los tejidos aéreos de la planta que también es utilizada en
967 la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

968 Una técnica ampliamente utilizada para la producción de compuestos activos es la generación de
969 raíces transformadas a través de la infección de tejidos vegetales con *Agrobacterium rhizogenes*.

970 Los cultivos de raíces pilosas acumulan metabolitos que normalmente se acumulan en los tejidos
971 aéreos de una planta intacta, crecen en medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento vegetal
972 y, además, son genética y bioquímicamente estables. Las investigaciones sobre la producción de
973 compuestos de interés farmacológico en cultivos de raíces pilosas de diferentes plantas medicinales
974 se han realizado en matraces con agitación orbital; no obstante, pocos procesos han sido escalados
975 a biorreactor. El empleo de biorreactores para cultivar raíces pilosas bajo condiciones controladas
976 es viable para la producción de compuestos activos. En este sistema biotecnológico es posible
977 optimizar las condiciones de cultivo para optimizar el crecimiento de las raíces pilosas y la
978 producción de metabolitos activos con interés de aplicaciones industriales, debido a que se
979 minimizan las variaciones en el rendimiento y la calidad del producto.

980 Con base en lo anterior, y considerando que especies de la familia Malvaceae son susceptibles a la
981 transformación genética mediada por *A. rhizogenes*, se propuso la generación de raíces pilosas de
982 *S. angustifolia* como una estrategia biotecnológica que permita la producción continua de
983 escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico, principales compuestos antiinflamatorios e
984 inmunomoduladores producidos por la planta silvestre y en el cultivo de células en suspensión de
985 esta especie. Además, con base al uso tradicional y actividades farmacológicas reportadas para los
986 extractos y compuestos se propuso evaluar el efecto gastroprotector del extracto diclorometano:
987 metanol del cultivo de células en suspensión en un modelo de úlceras gástricas en ratón inducidas
988 por etanol absoluto.

989

990 **Preguntas de investigación**

991 ¿La transformación genética mediante la infección de tejidos aéreos de *Sphaeralcea angustifolia*
992 con *Agrobacterium rhizogenes* generará líneas transformantes con altos rendimientos de
993 producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico?

994
995 ¿El extracto diclorometano: metanol de las células en suspensión transformadas, que presenta 2
996 compuestos no identificados, mostrará efecto gastroprotector en un modelo de úlcera gástrica
997 inducida por etanol absoluto en ratón?

998

999 **4. Hipótesis**

1000 La transformación genética mediada por la infección con *Agrobacterium rhizogenes* de nodos y
1001 hojas de *Sphaeralcea angustifolia* generará líneas de raíces pilosas y/o callos productores de los
1002 compuestos activos escopoletina, tomentina y/o ácido sphaerálcico.

1003
1004 El extracto diclorometano: metanol (9:1) de células en suspensión transformadas de *S. angustifolia*
1005 productora de compuestos antiinflamatorios y compuestos mayoritarios no identificados tendrán un
1006 efecto gastroprotector en el modelo de úlceras gástricas inducidas con etanol absoluto en ratón.

1007

1008

1009 **5. Objetivos Generales**

1010 Generar líneas de cultivos de raíces y células en suspensión transformadas de *Sphaeralcea*
1011 *angustifolia* productoras de escopoletina, tomentina y/o ácido sphaerálcico mediante la infección
1012 de tejidos aéreos con *Agrobacterium rhizogenes*.

1013
1014 Evaluar la actividad antiulcerogénica del extracto diclorometano: metanol (9:1) de células en
1015 suspensión transformadas en un modelo de úlceras gástricas inducidas con etanol absoluto en ratón
1016 e identificar al menos un compuesto en el extracto evaluado.

1017
1018 **5.1 Objetivos particulares**
1019 Establecer un protocolo de transformación genética de *S. angustifolia* a través de la selección del
1020 explante susceptible a la infección por las cepas de *A. rhizogenes* K599/pTDT, A4/pTDT o ATCC
1021 15834/pTDT.

1022
1023 Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras
1024 de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el
1025 análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1026
1027 Establecer cultivo de células en suspensión transformadas de *S. angustifolia* y cuantificación de
1028 compuestos activos mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1)
1029 de las células en suspensión.

1030
1031 Evaluar el efecto antiulcerogénico del extracto diclorometano: metanol (9:1) de células en
1032 suspensión transformadas de *S. angustifolia*, en un modelo de úlceras gástricas inducidas por etanol
1033 absoluto en ratón.

1034
1035 Aislar e identificar los 2 compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión
1036 transformadas de *S. angustifolia* que no se han identificado.

1037

Metodología

1038 **6. Materiales y Métodos**

1039 **6.1 Material vegetal de *Sphaeralcea angustifolia***

1040 Plantas con frutos de *S. angustifolia* se colectaron en la localidad de Huichapan, Estado de Hidalgo,
1041 México. Se integraron ejemplares botánicos de la planta y se depositaron en el herbario de plantas
1042 medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social en la Ciudad de México (IMSSM), para su
1043 registro (con número de registro 16412) y en el herbario de la Universidad Autónoma del Estado
1044 de Morelos (UAEM) 37527.

1045

1046 **6.1.1 Germinación *in vitro* de semillas**

1047 Se seleccionaron semillas, sin y con previa escarificación, y se desinfectaron en una solución de
1048 etanol al 70 % por 3 min, seguida de una solución de hipoclorito de sodio al 1.2 % por 10 min y 3
1049 enjuagues con agua destilada estéril. Todos los procedimientos se llevaron a cabo dentro de una
1050 campana de flujo laminar.

1051 Las semillas se sembraron en frascos tarro de vidrio con 40 mL de medio de cultivo semisólido de
1052 Murashige and Skoog (MS) al 50 %, 30 g/L de sacarosa, pH 5.7 y 3.0 g/L de PhytaGel; previo a su
1053 uso el medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1.2 kg/cm² de presión durante 18
1054 minutos. Los recipientes sembrados se incubaron a 26 °C con fotoperiodo de 16:8 h luz/oscuridad
1055 bajo 50 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz blanca fluorescente cálida. El número de semillas
1056 germinadas en promedio de 3 repeticiones se registró a los 10 días en cultivo en cada repetición y
1057 se compararon con una prueba de *t*-student cuyo valor de $p \leq 0.05$ fue considerado significativo
1058 empleando el software GraphPad Prism versión 8.0.

1059

1060 **6.2 Inducción de raíces pilosas por *Agrobacterium rhizogenes***

1061 Se cortaron segmentos nodales y de hojas de plántulas de 1 y 2 meses de edad y se sumergieron
1062 durante 10 min en una suspensión de las cepas bacterianas de *A. rhizogenes* K599/pTDT (tipo
1063 cucumopina), A4/pTDT y ATCC 15834/pTDT (tipo agropina) a una densidad óptica de 0.5 de
1064 absorbancia a $\lambda=550$ nm. El vector binario pTDT contiene el gen que codifica a la enzima treonina
1065 desaminasa del tomate el cual le confiere una fluorescencia roja al tejido vegetal transformado.
1066 Posteriormente, el exceso de la suspensión bacteriana en cada explante se eliminó sobre papel filtro

Metodología

1067 estéril y se transfirió a frasco con medio de cocultivo a base de medio MS gelificado sin sacarosa
1068 y se incubaron a 26 °C con fotoperiodo luz/oscuridad (16 h: 8 h) bajo 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad
1069 de luz blanca fluorescente cálida durante 48 y/o 72 horas.

1070 Transcurrido este tiempo, se procedió a la eliminación de la bacteria con una serie de tres lavados
1071 durante 30 minutos cada uno con agua destilada estéril conteniendo los antibióticos Ceftriaxona y
1072 Cefotaxima a una concentración de 300 mg/L cada uno. Consecutivamente, los explantes se
1073 secaron sobre una pieza de papel filtro estéril y enseguida se transfirieron a frascos con medio MS
1074 complementado con 10 g/L de sacarosa, los antibióticos antes mencionados a las mismas
1075 concentraciones y condiciones de incubación antes descritas. La aparición de las raíces en cada
1076 explante fue monitoreada diariamente.

1077

1078 **6.2.1 Individualización y selección de líneas de raíces pilosas**

1079 Las raíces pilosas emergidas en cada explante se individualizaron al alcanzar una longitud de 1.0
1080 cm, se clasificaron e identificaron por un número asignado al explante y a la raíz, de modo que
1081 cada una fuera identificada y considerada putativamente como una línea de raíz transformada. Las
1082 raíces pilosas clasificadas fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss
1083 V8) para valorar la emisión de fluorescencia roja que confirme la inserción del gen *tdt*.

1084 Las raíces se sub-cultivaron individualmente en caja de Petri con medio MS semisólido libre de
1085 fitorreguladores, con antibióticos y se incubaron en las condiciones previamente descritas; la
1086 concentración de los antibióticos se redujo gradualmente (200, 100 y 50 mg/L) hasta la eliminación
1087 de la bacteria. Los criterios de selección de las raíces pilosas fueron: 1) características físicas de
1088 raíces pilosas, 2) capacidad de crecimiento activo en ausencia de reguladores de crecimiento y 3)
1089 emisión de fluorescencia roja bajo el microscopio de epifluorescencia.

1090 La formación de callo en los explantes infectados se registró siguiendo la misma analogía y se
1091 cultivó en caja Petri con medio MS semisólido, libre de fito-reguladores de crecimiento, con
1092 antibióticos a las concentraciones antes mencionadas hasta la eliminación de la bacteria.

1093 Posteriormente, las líneas de raíces y callo transformados se cultivaron en frasco tipo tarro
1094 conteniendo 40 mL de medio MS semisólido complementado con 30 g/L de sacarosa, pH 5.7 y

Metodología

1095 libre de reguladores de crecimiento. Los cultivos se cambiaron a medio fresco en tarro cada 4
1096 semanas para su proliferación.

1097
1098 **6.2.2 Establecimiento de cultivos líquidos de raíces pilosas y células en suspensión**
1099 Cada línea de raíz pilosa (2 g) y callo transformado (3 g) se cultivaron en matraces Erlenmeyer con
1100 80 mL de medio líquido MS libre de reguladores de crecimiento, adicionando 30 g/L de sacarosa
1101 y ajustando el pH a 5.7. Los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C con fotoperíodo de 16 h luz/: 8 h de
1102 oscuridad bajo $50 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz fluorescente blanca cálida y agitación orbital a
1103 110 rpm (New Brunswick Scientific Co. Inc.). Cada 21 días, las suspensiones celulares y raíces
1104 transformadas se filtraron al vacío en embudo Buchner (papel de filtro Whatman No. 1, 9 cm de
1105 diámetro), las raíces y/o las células en suspensión retenidas se cambiaron a medio fresco
1106 conservando el mismo inóculo.

1107
1108 **6.2.3 Índice de crecimiento de raíces pilosas y células en suspensión**
1109 El crecimiento de las líneas de raíces pilosas seleccionadas y de las células en suspensión se evaluó
1110 después de 2 y 3 semanas en cultivo tipo lote. La medición se realizó por triplicado (tres matraces),
1111 cada matraz se filtró al vacío usando un embudo Buchner (papel de filtro Whatman No. 1, 9 cm de
1112 diámetro), las raíces retenidas y/o las células en suspensión se lavaron con agua destilada estéril;
1113 se determinó el peso fresco (PF) y los cultivos se secaron en estufa (Thelco 160 DM) a 65 °C
1114 durante 48 h. El índice de crecimiento (IC) a las 2 y 3 semanas de crecimiento se determinó en
1115 peso seco (PS) considerando la siguiente fórmula:

1116
$$IC = \frac{(PSF - PSI)}{PSI}$$

1117 Donde:
1118 PSF = Peso seco final de raíz y/o células en suspensión a 2 y 3 semana de cultivo.
1119 PSI = Peso seco inicial de raíz y/o células en suspensión al tiempo 0 de cultivo.

1120

Metodología

1121 Los datos obtenidos sobre el IC a cada tiempo de las líneas de raíces y/o células en suspensión
1122 transformadas se compararon con una prueba de ANOVA simple y una *post*-prueba de Tukey
1123 empleando el software SPSS versión 11 y SAS versión 9.1, cuyos valores de $p \leq 0.05$ se
1124 consideraron significativos.

1125

1126 **6.2.4 Confirmación de la transformación genética de raíces y células en suspensión**

1127 La transformación genética de las raíces pilosas y células en suspensión se confirmó por la
1128 presencia del gen *rolC* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en
1129 inglés). Para ello, el ADN de las raíces pilosas, células en suspensión y de planta silvestre se extrajo
1130 mediante el protocolo de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) establecido por Murray y
1131 Thompson (1980). Las reacciones en cadena de la polimerasa se llevaron a cabo para el gen *rolC*
1132 utilizando oligos específicos para este gen: 5' TGTGACAAGCAGCGATGAGC 3', 5'
1133 GATTGCAAACCTTGCACTCGC 3' generando un fragmento de 490 pb (Bonhomme et al., 2000).
1134 Como control negativo se utilizó la amplificación de un fragmento del gen *VirD2* que se encuentra
1135 en la bacteria de *A. rhizogenes* y no se transfiere a la planta. Para este fin se emplearon los oligos
1136 5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3' y 5'-ACCGTCGGCTCTACAAACCCAGTCC-3'
1137 generando un fragmento de 338 pb (Haas et al., 1995). La reacción se llevó a cabo utilizando un
1138 termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 95 °C
1139 por 5 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, 1 min de alineamiento
1140 a 50 °C y 1 min de elongación a 72 °C, finalmente 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR
1141 fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y visualizados por tinción con
1142 bromuro de etidio en un transiluminador con luz ultravioleta (BioDoc-it).

1143

1144 **6.3 Efecto de ácido naftalenacético (ANA) sobre el crecimiento y producción de activos en** 1145 **cultivos de células en suspensión**

1146 Después de 3 meses del establecimiento de la suspensión celular, se evaluó el efecto de la adición
1147 de ANA a diferentes concentraciones 1.0, 2.0, y 4.0 mg/L en combinación con una concentración
1148 constante de Kin (0.1 mg/L) al medio de cultivo, ajustados a pH 5.7 y adicionados con 30 g/L de
1149 sacarosa. Los cultivos se incubaron en las condiciones previamente descritas para la suspensión
1150 celular.

Metodología

1151 La producción de los compuestos activos (escopoletina y ácido sphaerálcico) y el crecimiento (IC)
1152 se evaluó a la semana 1, 2 y 3 en cultivo tipo lote como ya fue descrito. Los valores de IC y
1153 contenidos de escopoletina y ácido sphaerálcico obtenidos a cada tiempo de las células en
1154 suspensión transformadas se compararon con una prueba de ANOVA simple y una *post*-prueba de
1155 Tukey empleando el software SPSS versión 11 y SAS versión 9.1, cuyos valores de $p \leq 0.05$ se
1156 consideraron significativos.

1157

1158 **6.4 Cuantificación de compuestos activos de raíces pilosas y células en suspensión**

1159 **6.4.1 Extracción de biomasa**

1160 La biomasa seca de 3 matraces de cada línea de raíz pilosa y de células en suspensión a cada tiempo
1161 de cultivo, se extrajeron 3 veces por maceración (24 h para cada procedimiento) a temperatura
1162 ambiente con una mezcla de disolventes grado reactivo ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1 V/V; Merck) en una
1163 proporción de 1:50 (P/V). Los extractos se filtraron, se reunieron considerando el cultivo, línea y
1164 tiempo de evaluación, y se concentraron hasta sequedad a presión reducida. El contenido de ácido
1165 sphaerálcico y escopoletina en los extractos de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ se determinó mediante el análisis
1166 de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ya reportado (Pérez-Hernández et al., 2014;
1167 Nicasio-Torres et al., 2016; Nicasio-Torres et al., 2017; Pérez-Hernández et al., 2019).

1168

1169 **6.4.2 Extracción del medio de cultivo**

1170 El medio de cultivo filtrado de 3 matraces de las líneas de raíces transformadas SaTR 5.1, 7.1, 7.2
1171 15.1 y de células en suspensión adionadas con 1, 2 y 4 mg/L de ANA a cada tiempo de cultivo,
1172 se extrajeron por separado 3 veces mediante una bipartición empleando CH_2Cl_2 (Merck) en una
1173 proporción 1:1 (V/V). Los extractos se filtraron, se reunieron considerando el cultivo, línea y
1174 tiempo de evaluación, y se concentraron hasta sequedad a presión reducida. El contenido de ácido
1175 sphaerálcico y escopoletina en los extractos de CH_2Cl_2 se determinó mediante el análisis por HPLC
1176 (Pérez-Hernández et al., 2014; Nicasio-Torres et al., 2016; Nicasio-Torres et al., 2017; Pérez-
1177 Hernández et al., 2019).

1178

Metodología

1179 **6.4.3 Condiciones de HPLC**

1180 Los análisis de HPLC se realizaron utilizando un sistema Waters (módulo de separación 2695)
1181 acoplado a un detector de diodos (2996) con un rango de detección de 190-600 nm operado a través
1182 del sistema de software Manager Millennium (Empower 1; Waters Corp., Boston, MA, EE. UU).
1183 Las separaciones se realizaron en una columna Spherisorb RP-18 (250 x 4.6 mm, 5.0 μ m; Waters
1184 Corporation) utilizando una temperatura constante de 25 °C durante los análisis. Las muestras (20
1185 μ L) se eluyeron a un flujo de 1.0 mL/min con un gradiente de solventes de alta pureza: (A) H₂O
1186 con ácido trifluoroacético (TFA; 0.5%, Sigma Aldrich) y (B) CH₃CN de alta pureza (Merck). Los
1187 compuestos se detectaron controlando la absorbancia de escopoletina $\lambda = 344$ nm y ácido
1188 sphaerálcico $\lambda = 357$ nm. La identificación de escopoletina (99% de pureza; Sigma-Aldrich
1189 Chemical, México) y ácido sphaerálcico (95%) se realizó comparando sus espectros de absorción
1190 y sus tiempos de retención (escopoletina 10.3 min y ácido sphaerálcico 22.8 min). La relación de
1191 concentración para la cuantificación de escopoletina fue de 1.25 a 20 μ g/mL y para el ácido
1192 sphaerálcico de 2.5 a 40 μ g/mL. La ecuación de regresión para la escopoletina fue (y) = 165407
1193 (x) + 16720, $r^2 = 0.9993$, y para el ácido sphaerálcico fue (y) = 7381.9 (x) + 1362.2, $r^2 = 0.9998$,
1194 con $r^2 > 0.99$. El ácido sphaerálcico fue purificado de células en suspensión de *S. angustifolia*
1195 previamente con base al protocolo ya establecido y reportado (Pérez-Hernández et al., 2014;
1196 Nicasio-Torres et al., 2017; Serrano-Román et al., 2020).

1197 1198 **6.5 Análisis y fraccionamiento químico del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de células en suspensión** 1199 **transformadas**

1200 La biomasa seca (130g) de células en suspensión transformada se maceró por 72 h con
1201 CH₂Cl₂:CH₃OH (9:1 V/V) en una proporción 1:20 con respecto a la biomasa (P/V), el proceso de
1202 extracción se repitió 3 veces. Los extractos fueron filtrados usando papel filtro Whatman No.1,
1203 reunidos y concentrado mediante un rotavaporador Büchi-490 (Büchi, Flawil, Switzerland) a 40
1204 °C a presión reducida. El extracto (6.4 g) fue almacenado para su posterior análisis cromatográfico
1205 y farmacológico.

1206 El extracto (5.5 g) se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta (CCA) repleta con
1207 silica gel RP-18 (40-63 μ m; Merck) empleando un sistema de gradiente H₂O:CH₃CN grado

Metodología

1208 reactivo. Se colectaron 117 alícuotas de 10 mL las cuales se reunieron de acuerdo con su perfil
1209 cromatográfico en 16 fracciones (**Tabla 3**).

1210 El monitoreo de las reuniones se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando el
1211 sistema de elución agua: acetonitrilo 70:30 V/V, observación bajo lámpara de luz UV a 254 nm y
1212 365 nm, y empleando sulfato sérico como revelador. Las reuniones SaCsR3 (compuesto **1**) y
1213 SaCsR9 (compuesto **2**) fueron analizadas mediante HPLC bajo las condiciones de operación antes
1214 mencionadas; en la reunión SaCsR9 precipitó el compuesto **2** al adicionar acetonitrilo. La
1215 estructura de los compuestos fue determinada por análisis espectroscópicos de RMN ¹³C y ¹H.

1216
1217 **Tabla 3.** Sistema de elución en gradiente empleado en el fraccionamiento en columna abierta del
1218 extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de células en suspensión transformadas de *S. angustifolia*.

Agua (%)	Acetonitrilo (%)	Alícuotas	Reuniones	SaCsR
95	5%	1-8	1-3	1
			4	2
90	10%	9-16	5-11	3
85	15%	17-24	12-19	4
			20-26	5
80	20%	25-32	27-31	6
75	25%	33-42	32-38	7
			39-47	8
70	30%	43-53	48-56	9
65	35%	54-63	57-69	10
60	40%	64-74	70-78	11
55	45%	75-85	79-84	12
50	50%	86-95	85-89	13
30	70%	96-105	90-103	14
0	100%	106-117	104-111	15
			112-117	16

1219
1220 **6.6 Actividad antiulcerogénica**
1221 **6.6.1 Animales**
1222 Se emplearon ratones hembra de la cepa ICR con un peso promedio de 35 g. Los animales se
1223 mantuvieron a una temperatura de 22 ± 3 °C, una humedad del 70 ± 5 % y ciclos de luz y oscuridad
1224 de 12 h/12 h con acceso libre al agua y alimentos. Los experimentos se realizarán de acuerdo con
1225 la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción,

Metodología

1226 Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) y las normas éticas internacionales para el cuidado y
1227 uso de animales de laboratorio. El protocolo de Investigación se registró y aprobó por el Comité
1228 Local de Investigación y Salud (CLIS-1702) y Comité de (CONBIOETICA 17 CEI 00120190121)
1229 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el número de registro 2018-1702-016.

1230

1231 **6.6.2 Úlceras gástricas**

1232 Después de 24 h de ayuno, los ratones (n=4) fueron divididos al azar y sometidos a los siguientes
1233 tratamientos: 1) el grupo control negativo recibió una dosis de etanol absoluto de 0.12 mL/10 g de
1234 peso de ratón; el control positivo recibió una dosis a 10 mg/kg de omeprazol disuelto en agua
1235 destila a un volumen 0.12 mL/10 g de peso de ratón; el tratamiento experimental a base del extracto
1236 CH₂Cl₂:CH₃OH de células en suspensión a una dosis de 100 mg/kg disuelto en agua destila al
1237 volumen utilizado en los otros grupos. Una hora después del tratamiento, los ratones tratados con
1238 el fármaco y el extracto recibieron la dosis de etanol absoluto para inducir la formación de úlceras
1239 gástricas. Después de 1 h, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical previamente
1240 anestesiados pentobarbital sódico vía intraperitoneal (Sedalphorte^{MR}, 25 mg/kg).

1241 Cada estómago se abrió a lo largo de la curvatura mayor, se enjuagaron con agua destilada y
1242 posteriormente se retiró el exceso de agua. Los estómagos fueron fotografiados para la
1243 cuantificación del área total del estómago y el área lesionada de tejido usando el programa ImageJ,
1244 posteriormente los estómagos fueron almacenados a -20 °C. La presencia de bandas elongadas de
1245 lesiones hemorrágicas-rojas paralelas al eje más largo del estómago es un síntoma de úlcera
1246 gástrica. El índice de ulceración (IU) es determinado mediante la siguiente formula:

1247

1248

$$1249 \quad IU = \frac{\textit{área ulcerada}}{\textit{área total del estomago}}$$

1250

1251

1252

1253 El porcentaje de protección se obtuvo mediante la siguiente formula:

Metodología

1254

1255
$$\% \text{ de protección} = \left[\frac{(IU \text{ control} - IU \text{ tratamiento})}{IU \text{ control}} \right] * 100$$

1256

1257 Los valores de IU se compararon con una prueba de ANOVA simple y una *post*-prueba de Dunnett
1258 empleando el software SPSS versión 11 y SAS versión 9.1, cuyos valores de $p \leq 0.05$ se
1259 consideraron significativos.

1260 El % de protección entre los tratamientos se comparó con una prueba de *t*-student cuyo valor de p
1261 ≤ 0.05 fue considerado significativo empleando el software GraphPad Prism versión 8.0.

Objetivo 1 Establecer un protocolo de transformación genética de *S. angustifolia* a través de la selección del explante susceptible a la infección por las cepas de *A. rhizogenes* K599/pTDT, A4/pTDT o 15834/pTDT.

1262 7. Resultados

1263 7.1 Germinación *in vitro*

1264 El porcentaje de germinación de las semillas (8.57 %) se incrementó al implementar el proceso de
 1265 escarificación (65 %) con un lijado suave de la testa antes de la desinfección ($p = 0.003$). El bajo
 1266 porcentaje de germinación puede deberse a que la semilla se encuentra en un estado de dormancia
 1267 externa, lo cual podría deberse a que la testa de la semilla es muy dura e impide que la semilla
 1268 absorba humedad y haya intercambio gaseoso con el interior de la semilla.

1269

1270 7.2 Inducción de raíces pilosas por *A. rhizogenes*

1271 La sensibilidad de las plantas a la transformación depende de varios factores, como el tipo y edad
 1272 del explante, las condiciones de cultivo, la cepa bacteriana y las interacciones *Agrobacterium*-
 1273 huésped, entre otros (Colling et al. 2010). Explantes de 1 mes de edad fueron infectados con las
 1274 cepas de *A. rhizogenes* ATCC 15834/pTDT y K599/pTDT, sin embargo, no se generaron raíces en
 1275 los sitios de infección después de 4 semanas en cultivo. En cambio, los explantes de 2 meses de
 1276 edad fueron susceptibles a las 3 cepas de *Agrobacterium* probadas; la infección con la cepa
 1277 K599/pTDT solo tuvo respuesta en un explante de segmento nodal; la cepa A4/pTDT tuvo una
 1278 respuesta en explantes de segmento nodal de 33.1 ± 10.5 % y en hoja de 24.0 ± 4 %; sin embargo,
 1279 esta frecuencia de transformación fue menor que la cepa ATCC 15834/pTDT, que fue la que
 1280 presentó la mayor frecuencia de transformación (**Tabla 4**) en explantes de segmentos nodales (59.5
 1281 ± 10.5 %) y hoja (40 ± 25 %).

1282

1283 **Tabla 4.** Respuesta de explantes de hojas y segmentos nodales de plántulas de 2 meses de *S.*
 1284 *angustifolia* a la infección por cepas de *A. rhizogenes*.

Cepa	ATCC 15834/pTDT		A4/pTDT		K599/pTDT	
Explante	Segmento nodal	Hoja	Segmento Nodal	Hoja	Segmento nodal	Hoja
Frecuencia de transformación (%)	59.50±10.5*	40.0±25	33.1±10.5	24.0±4	1.65±1.65	NR
Número de raíces	145	52	43	31	2	NR
Número de callos	NR	1	NR	NR	NR	NR
Número de raíces pilosas	6	4	NR	NR	NR	NR

1285 Los valores de la frecuencia de transformación son la media de 2 experimentos \pm error estándar de la media ($n = 60$).

1286 De acuerdo con el ANOVA de frecuencia de transformación: $F = 17.7$, $p \geq 0.05$ y prueba de Tukey_{0.05} = 40.676

1287 Las medias con * fueron diferentes significativamente.

1288 NR: sin respuesta

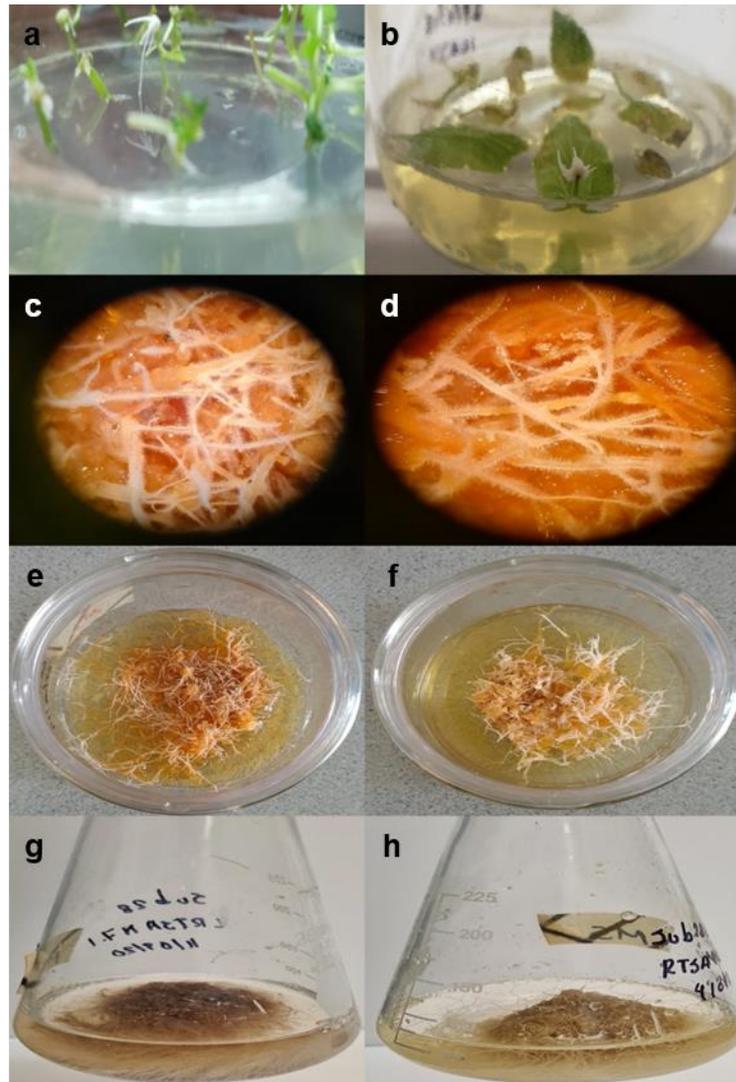
Objetivo 1 Establecer un protocolo de transformación genética de *S. angustifolia* a través de la selección del explante susceptible a la infección por las cepas de *A. rhizogenes* K599/pTDT, A4/pTDT o 15834/pTDT.

1289 Las raíces pilosas de explantes de *S. angustifolia* infectadas con las cepas ATCC 15834/pTDT y
1290 A4/pTDT aparecieron aproximadamente 7 días después del co-cultivo; en cambio, de la cepa
1291 K599/pTDT, las raíces emergieron después de 20 días. En algunos segmentos nodales aparece
1292 primero un callo blanquecino en el sitio de la infección y en otros únicamente emergen las raíces
1293 **(Figura 6)**.

1294 Ambos tipos de explantes mostraron susceptibilidad a la cepa de *A. rhizogenes* ATCC 15834/pTDT
1295 (Tabla 4); la mayor frecuencia de transformación se obtuvo en explantes nodales. Estas frecuencias
1296 relativamente bajas podrían deberse a la edad de los explantes de *S. angustifolia*, el tiempo de co-
1297 cultivo y la competencia para transformar esta especie de planta. Estos resultados son inferiores a
1298 los reportados para otras especies de la familia Malvaceae transformadas con cepas de *A.*
1299 *rhizogenes* ATCC 15834. Una frecuencia de transformación del $83\% \pm 5.2\%$ después de 5 días de
1300 co-cultivo se reportó para brotes de plántulas de *Althaea officinalis* con 15 días de germinación;
1301 del 97.33% para explantes de hojas y del 86.33% para tallos de plántulas de 15 días de *Urena*
1302 *lobate* L. (Phuong et al.2018; Tavassoli y Afshar 2018).

1303 Un callo friable se formó en un explante de hoja infectado con la cepa ATCC 15834/pTDT el cual
1304 proliferó en medio MS libre de reguladores de crecimiento.

Objetivo 1 Establecer un protocolo de transformación genética de *S. angustifolia* a través de la selección del explante susceptible a la infección por las cepas de *A. rhizogenes* K599/pTDT, A4/pTDT o 15834/pTDT.



1305

1306 **Figura 6.** Inducción de raíces pilosas en explantes de hojas y segmentos nodales de plántulas de *S.*
1307 *angustifolia*. Aparición de raíces pilosas en: **a** segmentos nodales y **b** explantes de hojas (7-20 días); **c, d**
1308 característica morfológica de la raíz pilosa (12 semanas); **e, f** raíces cultivadas en medio MS semisólido (18
1309 semanas); **g, h** propagación de biomazas en medio líquido MS (subcultivo 28).

1310

Objetivo 2: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1311 **7.2.1 Individualización y selección de líneas de raíces pilosas**

1312 Todas las raíces individualizadas cultivadas en un medio MS semisólido se observaron bajo un
1313 microscopio de epifluorescencia y ninguna de ellas mostró fluorescencia roja. Las raíces pilosas
1314 que mostraran fluorescencia roja implicaría eventos de doble transferencia de ADN-T al genoma
1315 de la planta, uno proveniente del plásmido Ri de tipo silvestre y el otro del vector binario pTDT
1316 portado por la misma cepa de *A. rhizogenes*. La ausencia de fluorescencia roja en estas raíces
1317 pilosas podría deberse a que no se insertó el ADN-T del vector binario pTDT en el genoma de la
1318 planta, o que el sitio donde se insertó el ADN-T no permite la expresión de este gen. Resultados
1319 similares fueron obtenidos por Moreno-Anzures et al. (2017) en la transformación de la especie
1320 *Lopezia racemose* Cav.

1321 Las siete líneas de raíces, 1 de hojas (SaTR H2.2) y 6 de nodos (SaTR N5.1, SaTR N7.1, SaTR
1322 N7.2, SaTR N12.2, SaTR N12.4 y SaTR N15.1), putativamente transformadas obtenidas de la
1323 infección con la cepa ATCC 15834/pTDT presentaron variabilidad en su morfología y crecimiento,
1324 estas diferencias podrían deberse a que cada clon de raíz fue el resultado de un evento de
1325 transformación independiente (Batra et al., 2004). Las líneas de raíces pilosas seleccionadas fueron
1326 aquellas que mostraron crecimiento activo en un medio semisólido sin reguladores de crecimiento
1327 vegetal, presentando mayor ramificación lateral y crecimiento plagiotrópico.

1328

1329 **7.2.2 Establecimiento de cultivos líquidos de raíces pilosas**

1330 Cuando las raíces pilosas se transfirieron al medio de cultivo líquido, la línea SaTR N7.2 formó
1331 pequeños callos no friables y las líneas SaTR N5.1, SaTR N7.1, SaTR N7.2 y SaTR N15.1
1332 mostraron medios de cultivo con un pigmento rojizo. Las líneas SaTR 12.2 y la línea SaTR H2.2
1333 no presentaron el color rojizo observado en las otras líneas de raíz. Esta variación podría deberse a
1334 alteraciones genéticas provocadas por la expresión de genes ADN-T de *A. rhizogenes* y a su sitio
1335 de integración o al número de copias y la orientación de inserción en el genoma de la planta
1336 (Chandra, 2012).

Objetivo 2: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1337 7.2.3 Índice de crecimiento

1338 El crecimiento de las raíces pilosas en lotes se evaluó después de ocho subcultivos en medio líquido
 1339 MS (6 meses). Las líneas de raíces pilosas SaTR N5.1, SaTR N12.2 y SaTR N12.4 presentaron el
 1340 índice de crecimiento más alto después de 3 semanas de cultivo (**Tabla 5**). Estos resultados son
 1341 similares a los estudios realizados con cultivos de raíces pilosas de *P. candollei* var. *Candollei*
 1342 cultivado en matraces con un inóculo del 1% en medio de cultivo B5, con un índice de crecimiento
 1343 de 9 a los 25 días de cultivo (Danphitsanuparn et al., 2012). Los cultivos de raíces pilosas de *Salvia*
 1344 *officinalis* obtenidos con *A. rhizogenes* cepa ATCC 15834 y cultivados en medio líquido Wooden
 1345 Plants, presentaron un índice de crecimiento de 11 a las 4 semanas de cultivo (Grzegorzczuk et al.,
 1346 2006).

1347
 1348 **Tabla 5.** Índice de crecimiento de líneas de raíces pilosas de *Sphaeralcea angustifolia*
 1349 transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834/pTDT.

Línea de raíz	Peso seco inicial (g)	Índice de crecimiento	
		2 semanas	3 semanas
SaTR N5.1	0.153±0.02	5.02± 0.47**	6.84±0.84**
SaTR N7.1	0.206±0.04	1.17±0.77	3.33±1.46
SaTR N7.2	0.175±0.03	1.0±0.15	1.47±0.30
SaTR N12.2	0.121±0.01	2.33±0.86	5.82±0.54*
SaTR N12.4	0.184±0.01	2.51±0.11	5.95±0.45*
SaTR N15.1	0.186±0.03	1.15±0.37	3.20±0.68
SaTR H2.2	0.155±0.20	2.65±0.76	4.86±0.22

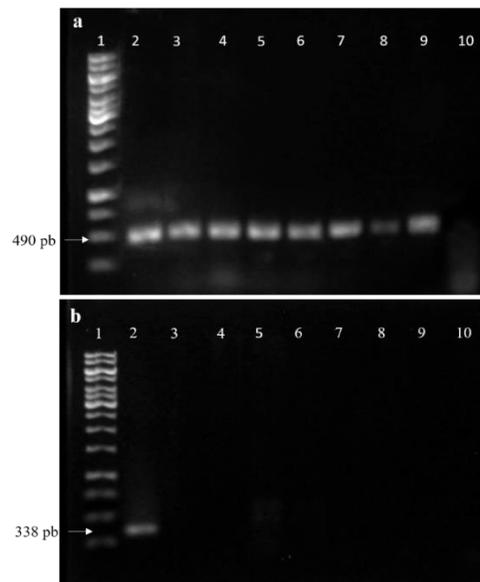
1350 Los valores son la media ± desviación estándar (n = 3).
 1351 De acuerdo con el ANOVA y prueba de Tukey, las medias con * y ** fueron significativamente diferentes
 1352 F = 18.04, ** $p < 0.01$, Tukey_{0.05} = 1.59 para 2 semanas; F = 19.26, ** $p < 0.01$, Tukey_{0.05} = 2,09 para 3 semanas

1353
 1354 **7.2.4 Confirmación de la transformación genética**
 1355 La transformación genética de las líneas de raíces pilosas seleccionadas se confirmó mediante un
 1356 procedimiento rápido y eficaz utilizado en informes anteriores, que amplifica un fragmento del gen
 1357 *rolC* por PCR (**Figura7**) y un fragmento del gen *VirD2*; este último gen no se transfiere al genoma

Objetivo 2: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1358 de la planta y se ha utilizado para confirmar que los cultivos de raíces pilosas estén libres de la
1359 bacteria *A. rhizogenes* (Häkkinen et al., 2016; Moreno-Anzúrez et al., 2017). Se sabe que, con
1360 cierta frecuencia, el ADN-T de *Agrobacterium* no se transfiere completamente al genoma de la
1361 planta (Rossi et al., 1996).

1362



1363

1364 **Figura 7.** Productos de PCR de líneas de raíces pilosas transformadas de *Sphaeralcea angustifolia* **a)** Carril
1365 1: marcador de ADN de 1 Kb, carril 2: banda amplificada de *rolC* del ADN de *Agrobacterium rhizogenes*
1366 (control positivo), carril 3 a 9: banda amplificada de *rolC* del ADN de raíces pilosas (SaTR H2.2, N5.1,
1367 N7.1, N7.2, N12.2, N12.4, N15.1, respectivamente), carril 10: ADN de plántulas silvestres de *Sphaeralcea*
1368 *angustifolia* (control negativo). **b)** Carril 1: marcador de ADN de 1 Kb, carril 2: banda amplificada de *VirD2*
1369 de ADN de *Agrobacterium rhizogenes* (control positivo), carril 3 a 9: ADN de raíces pilosas (SaTR H2.2,
1370 N5.1, N7.1, N7. 2, N12.2, N12.4, N15.1, respectivamente), carril 10 ADN de plántulas silvestres de
1371 *Sphaeralcea angustifolia* (control negativo).

1372

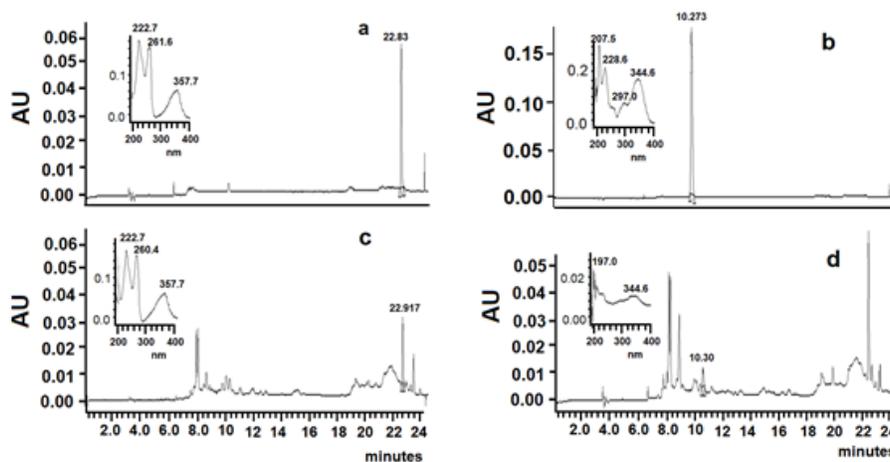
1373 7.3 Análisis de compuestos activos de raíces pilosas

1374 La presencia de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico en los extractos diclorometano-
1375 metanol (raíces pilosas secas) y diclorometano (medio de cultivo líquido) de 7 líneas de *S.*
1376 *angustifolia* se confirmó mediante la comparación de sus tiempos de retención y espectros de
1377 absorción de los compuestos detectados en los análisis por HPLC (**Figura 8**). El compuesto
1378 tomentina no se detectó en ninguno de los extractos de las líneas de raíces pilosas analizadas. A

Objetivo 2: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1379 excepción de las líneas SaTR N12.2 y SaTR H2.2, 4, 5 líneas de raíces pilosas tienen el potencial
1380 de producir escopoletina y ácido sphaerálcico. La línea de raíz pilosa SaTR N12.4 solo produce
1381 ácido sphaerálcico y se acumula en la biomasa; en tanto que la línea SaTR H2.2 no se detectó
1382 escopoletina ni ácido sphaerálcico (**Tabla 6**). Escopoletina se identificó como el compuesto
1383 antiinflamatorio en tejidos aéreos de plantas silvestres y en cultivo de células en suspensión de *S.*
1384 *angustifolia*; el ácido sphaerálcico es un compuesto *de novo* identificado en las células en
1385 suspensión cultivadas en medio MS bajo restricción de nitratos (García-Rodríguez et al., 2012;
1386 Pérez-Hernández et al., 2014). De acuerdo con el ANOVA y la prueba de Tukey, la línea SaTR
1387 N7.2 tuvo los contenidos más altos de escopoletina y ácido sphaerálcico a las 2 y 3 semanas de
1388 cultivo; sin embargo, esta línea de raíz pilosa presentó el índice de crecimiento más bajo. El
1389 rendimiento de escopoletina fue 75 veces mayor que el detectado en la planta silvestre y 39 veces
1390 mayor que el reportado para cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* (0.038 mg g⁻¹ PS)
1391 cultivados en medio MS completo adicionado con 1.0 mg L⁻¹ de ANA y 0.1 mg L⁻¹ de Kin. El
1392 rendimiento de ácido sphaerálcico fue 440 veces superior al determinado en plantas silvestres y
1393 tres dígitos superiores al reportado en células en suspensión (0.0144 mg g⁻¹) cultivada en medio
1394 MS completo (Nicasio-Torres et al., 2016).

1395



1396

1397 **Figura 8.** Cromatogramas de HPLC y espectros de absorción de estándares: **a)** tiempo de retención de ácido
1398 sphaerálcico 22.83 min. y **b)** tiempo de retención de escopoletina 10.27; **c)** ácido sphaerálcico y **d)**
1399 escopoletina detectados en el extracto de diclorometano-metanol de la línea de raíz pilosa SaTR N7.2 de *S.*
1400 *angustifolia*.

Objetivo 2: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1401 **Tabla 6.** Acumulación de escopoletina y ácido sphaerálcico en cultivos de raíces pilosas de *S.*
1402 *angustifolia*

Línea de raíz	Escopoletina (mg/g DW)			Ácido sphaerálcico (mg/g DW)		
	2 semanas	3 semanas	2 años	2 semanas	3 semanas	2 años
SaTR N5.1	0.003 ± 0.001	0.004±0.002	0.001 ± 0.0003	0.64±0.3*	0.58±0.3	1.10 ± 0.33**
SaTR N7.1	0.001 ± 0.001	0.001±0.001	0.011 ± 0.002**	0.18±0.05	0.46±0.2	1.22 ± 0.17**
SaTR N7.2	0.151±0.02**	0.08±0.03**	0.007 ± 0.002	17.6±1.72**	8.3±2.11**	1.16 ± 0.08**
SaTR N12.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SaTR N12.4	ND	ND	ND	0.02±0.006	0.03±0.005	0.052 ± 0.01
SaTR N15.1	0.003±0.004	0.004±0.002	0.003 ± 0.0003	0.17±0.15	0.6±0.26	1.57 ± 0.30**
SaTR H2.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Planta silvestre	0.002±0.02			0.04±0.001		

1403 Los valores son la media ± desviación estándar (n = 3).

1404 De acuerdo con el ANOVA y prueba de Tukey, las medias con * y ** fueron significativamente diferentes.
1405 Escopoletina F = 224.2; $p < 0,01$; Tukey_{0.05} = 0.022 para 2 semanas; F = 16.9; $p < 0,01$; Tukey_{0.05} = 0.041 para 3
1406 semanas; F = 12.8; $p = 0,016$; Tukey_{0.05} = 0.007 para 2 años. Ácido sphaerálcico F = 292.9; $p < 0,01$; Tukey_{0.05} = 2.11
1407 para 2 semanas; F = 13.75; $p < 0,01$; Tukey_{0.05} = 4.46 durante 3 semanas; F = 14.1; $p = 0.0062$; Tukey_{0.05} = 0.86 por 2
1408 años. ND: No Detectado

1409
1410 La investigación previa en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* informó un aumento
1411 en la producción de ácido sphaerálcico y escopoletina al reducir la concentración de nitratos totales
1412 en el medio de cultivo MS. El mayor rendimiento de ácido sphaerálcico (0.0672 mg/g PS) y
1413 escopoletina (0.4 mg/g PS) se obtuvieron con reducción de nitratos a 0.274 mM y 2.74 mM,
1414 respectivamente (Pérez-Hernández et al., 2014; Nicasio-Torres et al. 2016). El rendimiento de
1415 escopoletina obtenido en las células en suspensión fue sólo 2.6 veces mayor que el detectado en la
1416 línea de raíces pilosas SaTR N7.2, y el rendimiento de ácido sphaerálcico fue 260 veces superior
1417 en la línea de raíz pilosa SaTR N7.2. En otro estudio, cultivos de células en suspensión de *S.*
1418 *angustifolia* cultivados en un biorreactor tipo tanque agitado con medio MS y restricción de nitrato
1419 (2.74 mM) produjeron principalmente ácido sphaerálcico (Pérez et al., 2019a), cuyo rendimiento
1420 (3.47 mg/g PS) fue cinco veces menor que el producido en la línea SaTR N7.2. La línea de raíz
1421 pilosa SaTR N7.2 se identificó con el menor índice de crecimiento y la mayor productora de
1422 escopoletina y ácido sphaerálcico.

Objetivo 2: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1423 La cantidad de escopoletina y ácido sphaerálcico excretada fue similar para las líneas de raíces
 1424 pilosas SaTR N7.1, SaTR N7.2 y SaTR N15. Los medios de cultivo de las líneas de raíces pilosas
 1425 SaTR N5.1, SaTR N7.1, SaTR N7.2 y SaTR N15.1 contenían principalmente ácido sphaerálcico;
 1426 las líneas SaTR N7.2, SaTR N7.1 y SaTR N15.1 presentaron el contenido más alto a las 2 y/o 3
 1427 semanas de cultivo (**Tabla 7**). Estos rendimientos son superiores a los reportados en cultivos de
 1428 células en suspensión (0.244 mg L^{-1}) con restricción de nitrato 0.274 mM (Nicasio-Torres et al.
 1429 2016). En cambio, en los cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia*, estimulada por la
 1430 interacción de la reducción de nitratos totales a 2.74 mM y el aumento de cobre a $2 \text{ }\mu\text{M}$, la
 1431 producción de escopoletina y tomentina analizados en mezcla (4.137 mg L^{-1}) fue superior a la
 1432 acumulada en la línea de raíz pilosa SaTR N7.2. Sin embargo, los niveles de cumarinas (4.008 mg
 1433 L^{-1}) y ácido sphaerálcico (6.107 mg L^{-1}) excretados al medio de cultivo fueron inferiores a los
 1434 excretados por la línea de raíz pilosa SaTR N7.2 (Pérez-Hernández, et al. 2019b). La línea SaTR
 1435 N7.1 fue la que tuvo el mayor rendimiento de escopoletina a las 3 semanas de cultivo (0.73 ± 0.44
 1436 mg L^{-1}), este contenido fue menor al reportado por Nicasio-Torres et al. (2016) en cultivos de
 1437 células en suspensión de *S. angustifolia*.

1438
 1439 **Tabla 7.** Excreción de escopoletina y ácido sphaerálcico al medio de cultivo de raíces pilosas de
 1440 *S. angustifolia*

Línea de raíz transformada	Escopoletina (mg L^{-1})		Ácido sphaerálcico (mg L^{-1})	
	2 semanas	3 semanas	2 semanas	3 semanas
SaTR N5.1	0.16 ± 0.08	0.04 ± 0.03	11.99 ± 3	11.14 ± 6.4
SaTR N7.1	0.27 ± 0.1	0.73 ± 0.44	8.9 ± 2.5	18.25 ± 2.8
SaTR N7.2	0.43 ± 0.06	0.21 ± 0.03	15.5 ± 2.2	15.50 ± 2.0
SaTR N15.1	0.35 ± 0.1	0.06 ± 0.04	9.06 ± 4.8	17.11 ± 6.6

1441 Los valores son la media \pm desviación estándar ($n = 3$).
 1442 De acuerdo con el ANOVA escopoletina $F = 1.71$, $p > 0.05$ para 2 semanas y $F = 2.1$, $p > 0.05$ para 3 semanas; ácido
 1443 sphaerálcico $F = 0.88$, $p > 0.05$ por 2 semanas y $F = 0.40$, $p > 0.05$ para 3 semanas

1444
 1445 La correlación entre el crecimiento y la producción de compuestos activos indicó que la producción
 1446 de escopoletina y ácido sphaerálcico es similar en las líneas de raíces pilosas SaTR N5.1, SaTR

Objetivo 2: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1447 N7.1 y SaTR N15.1 (**Tabla 8**). La línea de raíz pilosa SaTR N12.4 crece bien, solo produce ácido
 1448 sphaerálcico y se acumula en la biomasa (**Tabla 5**). La línea de raíz pilosa SaTR N7.2 es la mayor
 1449 productora de escopoletina y ácido sphaerálcico, no obstante, esta sobreproducción afecta
 1450 negativamente su crecimiento posiblemente por un efecto tóxico o alelopático que ejercen los
 1451 compuestos fenólicos como inhibición del alargamiento de la raíz de la planta y la división celular
 1452 que interfieren con el crecimiento y desarrollo normal de una planta (John y Sarada, 2012). Los
 1453 compuestos furanocumarina son conocidos por su fitotoxicidad y se encuentran principalmente en
 1454 especies de las familias Apiaceae y Rutaceae. En parte, las furanocumarinas se sintetizan en las
 1455 vías de fenilpropanoide y mevalonato mediante el acoplamiento de pirofosfato de dimetilalilo y 7-
 1456 hidroxycumarina. Por lo general, estos compuestos se vuelven tóxicos cuando son activados por
 1457 radiación (UV-A), provocando que algunas furanocumarinas se activen a un estado electrónico de
 1458 mayor energía; debido a esta activación, las furanocumarinas entran en la doble hélice del ADN y
 1459 se unen a las pirimidinas, condición que provoca la muerte celular debido al bloqueo de la
 1460 transcripción y reparación del DNA. Estos compuestos también poseen propiedades mutagénicas
 1461 y cancerígenas (Rice, 1987; Mazid y Mohammad, 2011).

1462
 1463 **Tabla 8.** Producción de escopoletina y ácido sphaerálcico por biomasa total en cultivo de raíces
 1464 pilosas de *S. angustifolia*

Línea de raíz	Escopoletina (mg/biomasa total)		Ácido sphaerálcico (mg/biomasa total)	
	2 semanas	3 semanas	2 semanas	3 semanas
SaTR N5.1	0.003 ± 0.001	0.005 ± 0.002	0.572 ± 0.25	0.612 ± 0.33
SaTR N7.1	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.125 ± 0.03	0.416 ± 0.21
SaTR N7.2	0.052 ± 0.01**	0.033 ± 0.013**	6.140 ± 1.352**	3.6 ± 1.63**
SaTR N15.1	0.002 ± 0.002	0.004 ± 0.002	0.125 ± 0.1	0.645 ± 0.43

1465 Los valores son la media ± desviación estándar (n = 3).
 1466 De acuerdo con el ANOVA y prueba de Tukey, las medias con ** fueron significativamente diferentes.
 1467 Escopoletina F = 13.90; p <0,01; Tukey_{0.05} = 0.0181 para 2 semanas; F = 92,83; p <0.01; Tukey_{0.05} = 0.0119 para 3
 1468 semanas Ácido sphaerálcico F = 52.81; p <0,01; Tukey_{0.05} = 1.82 para 2 semanas; F = 9.26; p <0.01; Tukey_{0.05} = 2.27
 1469 para 3 semanas

1470
 1471 El análisis químico de escopoletina y ácido sphaerálcico en los extractos de diclorometano: metanol
 1472 de las raíces pilosas SaTR N5.1, SaTR N7.1, SaTR N7.2 y SaTR N15.1 después de 2 años en

Objetivo 2: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1473 cultivo, mostró que las raíces pilosas conservan la capacidad de producir ambos compuestos en
1474 niveles similares; la producción de escopoletina fue similar y el ácido sphaerálcico superior a los
1475 presentados en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* sin estimulación (**Tabla 6**).

1476 La producción exitosa de compuestos bioactivos mediante el cultivo de raíces pilosas de *S.*
1477 *angustifolia* se puede incrementar por medio de la aplicación de los estimuladores bióticos
1478 explorados en las células en suspensión de *S. angustifolia* para la producción de escopoletina y
1479 ácido sphaerálcico, ya sea por el efecto individual o sinérgico por la combinación de la reducción
1480 de nitrato total y el aumento de sulfato de cobre en medio MS, así como también utilizando ácido
1481 jasmónico (AJ) o ácido salicílico. El ácido jasmónico se ha utilizado como elicitor en varios
1482 estudios y se ha descubierto que aumenta los contenidos de algunos metabolitos como los
1483 glucosinolatos, las antocianinas y los ácidos fenólicos (Smetanska et al., 2007). La elicitación de
1484 100 a 200 μM de ácido jasmónico durante 2 semanas de cultivo se determinaron como óptimos
1485 para el rendimiento máximo de glucosinolatos en cultivos de raíces pilosas de *S. alba*, y a 4 semanas
1486 de cultivo con 50 a 100 μM AJ fue lo óptimo para *B. rapa* (Kastell et al., 2013).

1487 La elicitación por metil jasmonato (MeJ; 25, 50 y 100 μM) y sacarosa (15 y 30 g/L) incrementó la
1488 producción de una cumarina farmacéuticamente activa (umckalina) y fenoles (ácido gálico,
1489 vainílico y *p*-cumárico) en cultivos de raíces pilosas de *P. sidoides*, rendimientos
1490 considerablemente más altos a los obtenidos en los cultivos de control (Yousefian et al., 2020).

1491 El proceso biotecnológico optimizado en cultivos de raíces pilosas de *S. angustifolia* se podría
1492 escalar a biorreactores (tipo: fase líquida, fase gaseosa y mixtos, que es una combinación de ambos)
1493 ya explorados para el cultivo de raíces pilosas de otras especies (Yancheva et al., 2019). Asimismo,
1494 se ha demostrado que los sistemas de inmersión temporal son muy apropiados para el cultivo de
1495 raíces pilosas y la producción de valiosos metabolitos secundarios derivados de plantas (Georgiev
1496 et al., 2012; 2014).

Objetivo 2: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1497 **Perspectivas de Objetivo.**

1498 Las líneas 5.1 7.1, 7.2 y 15.1 presenta un índice de crecimiento bajo, producen escopoletina y ácido
1499 sphaerálcico. En estas raíces pilosas se pueden hacer estudios para incrementar la producción de
1500 escopoletina y ácido sphaerálcico mediante la restricción de nitratos y adición de cobre al medio
1501 de cultivo MS para elicitación de las células y determinar si hay un aumento en la producción de los
1502 activos.

1503
1504 En la línea 7.1 se detectaron compuestos con espectros de absorción similares al de ácido
1505 sphaerálcico y tiempos de retención cercanos. Estos compuestos podrían ser isómeros del ácido
1506 sphaerálcico y poseer propiedades antiinflamatorias, por ello se propone aislar y caracterizar
1507 química y biológicamente estos compuestos.

1508
1509 La línea de raíz 5.1 es productora de escopoletina y ácido sphaerálcico. Estas raíces pilosas tienen
1510 uno de los mejores índices de crecimiento y se pueden cultivar en un sistema de inmersión
1511 temporal. En estos tipos de sistemas evidencias de ser una opción para el escalamiento de cultivos
1512 de raíces transformadas.

1513
1514 La línea de raíz 7.2 presentó el menor índice de crecimiento y la que mayor acumulación de ácido
1515 sphaerálcico presentó. Esta línea de raíces pilosas podría cultivarse en medio MS complementado
1516 con la hormona ANA con concentraciones superiores a las utilizadas en el cultivo de células en
1517 suspensión transformadas, y evaluar el efecto de esta hormona sobre el crecimiento del cultivo y
1518 producción de ácido sphaerálcico.

1519
1520 Establecer un cultivo continuo en biorreactor con la línea de raíces pilosas 7.2 caracterizada por
1521 tener un crecimiento lento y excretar altas concentraciones de ácido sphaerálcico como sistema
1522 producción escalable de este compuesto.

Objetivo 3: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1523 **7.4 Cultivo de células en suspensión**

1524 El índice de crecimiento de los cultivos de células en suspensión libre de hormonas y con la adición
 1525 de ANA a diferentes concentraciones se evaluó después de 6 subcultivos (4 meses). En
 1526 comparación con la línea de células en suspensión no transformada, la línea de células
 1527 transformadas cultivada en medio MS complementado con ANA presentó el mayor índice de
 1528 crecimiento a las 2 y 3 semanas (**Tabla 9**). Estos resultados son similares a lo reportado en células
 1529 en suspensión de *S. angustifolia* (7.91 ± 0.65) cultivadas con restricción de nitratos (2.74 mM) a
 1530 los 16 días en cultivo, tiempo en donde alcanzo la máxima producción de biomasa (Nicasio-Torres
 1531 et al., 2016).

1532
 1533 **Tabla 9.** Índice de crecimiento de cultivos de células en suspensión de *Sphaeralcea angustifolia*.

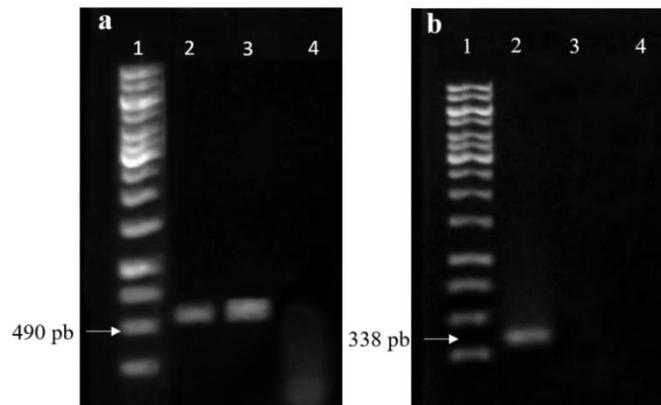
Tratamiento	Índice de crecimiento		
	Peso inicial (g PS)	2 semanas	3 semanas
SaH3.1 Sin Hormonas	0.1684±0.01	7.26±0.8	6.689±0.7
SaH3.1 Con Hormonas	0.1509±0.01	9.48±0.6**	8.103±0.9**
Suspensión no transformada	0.1684±0.001	6.315±0.2	5.425±0.6

1534
 1535 Los valores son la media ± desviación estándar (n=3).
 1536 De acuerdo con el ANOVA y prueba de Tukey, las medias con ** fueron significativamente diferentes
 1537 2 semanas; F= 22.65; $p < 0.001$; Tukey_{0.05}= 1.48; 3 semanas; F=10.21; $p < 0.01$; Tukey_{0.05}= 1.81.

1538
 1539 La transformación de la línea celular SaH3.1 se confirmó mediante PCR al amplificar una banda
 1540 de 490 pb de un fragmento del gen *rolC* (**Figura 9**). De acuerdo con reportes, la expresión del gen
 1541 *rolC* no muestran efecto negativo sobre el crecimiento de callos transformados (Shkryl et al. 2008).

1542

Objetivo 3: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.



1543
1544 **Figura 9.** Confirmación de la inserción del gen *rolC* en el genoma de línea celular SaH3.1 de *S. angustifolia*.
1545 **A)** amplificación de fragmento de 490 pb. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb. Carril 2 control
1546 positivo, carril 3: muestra de ADN de la línea SaH3.1. **B)** Ausencia de amplificación de *VirD2*. Carril 1:
1547 marcador de peso molecular 1KB. Carril 2: control positivo. Carril 3 muestra de ADN de la línea H3.1.

1548

1549 **7.4.1 Producción de ácido sphaerálcico en cultivo de células en suspensión**

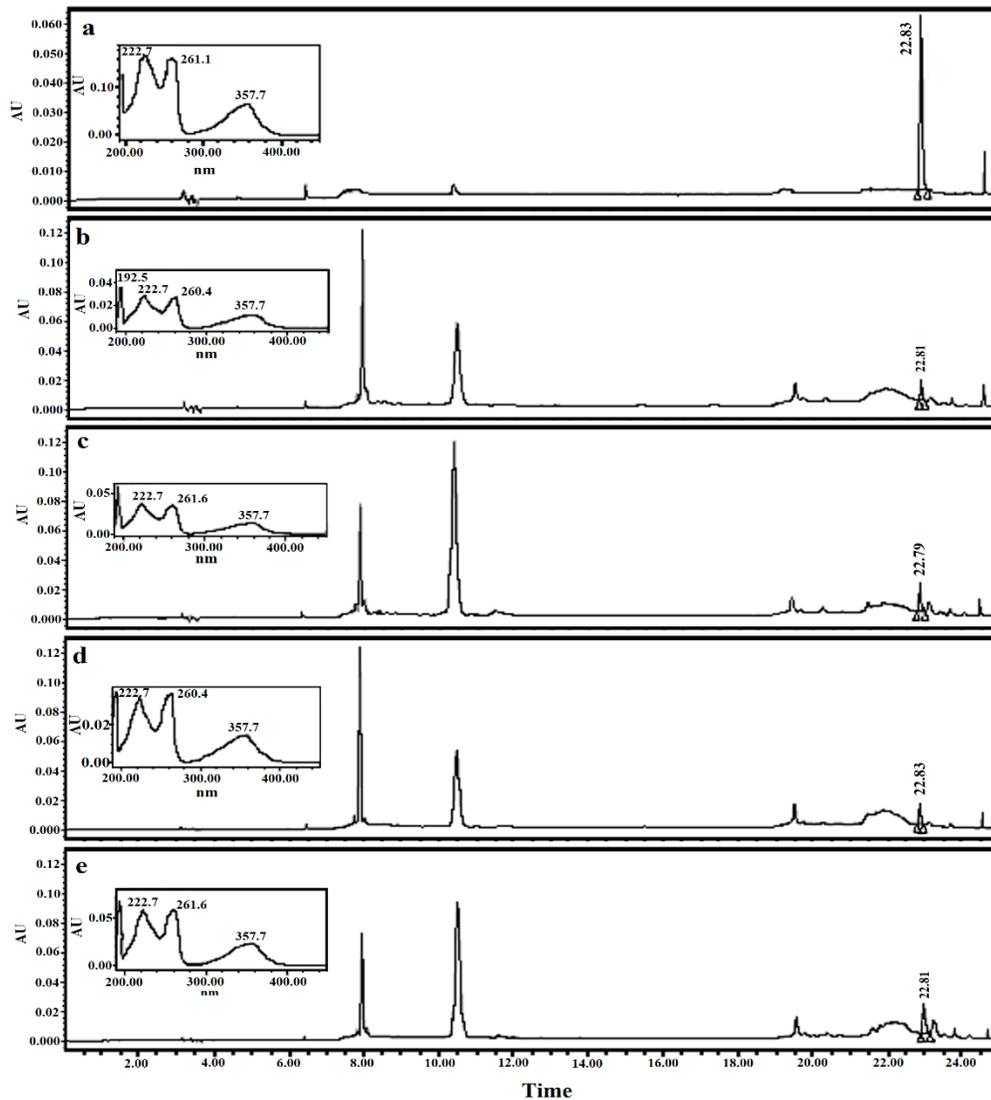
1550 El análisis por HPLC de los extractos $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) de biomasa seca de células en
1551 suspensión a las 2 y 3 semanas de cultivo, mostró la producción de ácido sphaerálcico mediante la
1552 comparación del tiempo de retención y espectro de absorción con el del estándar de ácido
1553 sphaerálcico (**Figura 10**). La producción de ácido sphaerálcico en las suspensiones celulares de la
1554 línea SaH3.1 transformada cultivadas con la adición de hormas fue el doble al obtenido en la
1555 suspensión cultivada sin hormonas (**Tabla 10**). Este rendimiento fue 26 veces superior al obtenido
1556 en la suspensión celular cultivada en medio MS (0.0144 mg/g) y 10.5 veces superior a lo reportado
1557 en cultivos de células en suspensión con restricción de nitratos a 0.274 mM (Nicasio-Torres et al.
1558 2016). No obstante, la producción de ácido sphaerálcico es inferior a lo reportado (3.47 mg/g PS)
1559 en cultivos de células en suspensión de *S. angustifolia* cultivada en un biorreactor de agitación
1560 mecánica (Pérez-Hernández et al. 2019a).

1561 Existen reportes del uso de sulfato de cobre como elicitador en cultivos de células en suspensión de
1562 *Tilia americana* var. mexicana (Cisneros- Torres et al., 2019), *Sphaeralcea angustifolia* (Pérez-
1563 Hernández et al., 2019b), *Angelica archangelica* (Siatka et al., 2017) para incrementar la
1564 producción de escopoletina, estrategia que puede ser aplicada al cultivo de células en suspensión

Objetivo 3: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1565 de la línea SaH3.1 transformada de *S. angustifolia*; además de la restricción de nitratos totales
1566 ((Nicasio-Torres et al. 2016; Pérez-Hernández et al., 2019b).

1567



1568 **Figura 10.** Cromatogramas y espectros de absorción del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de cultivos en suspensión
1569 de células transformadas de *S. angustifolia*. a) Estándar de ácido sphaerálcico, b) Cultivo celular sin
1570 hormonas 2 semanas, c) Cultivo celular con hormonas 2 semanas, d) Cultivo celular sin hormonas 3
1571 semanas, e) Cultivo celular con hormonas 3 semanas.

1573

Objetivo 3: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1574 Los compuestos escopoletina y ácido sphaerálcico no se detectaron en el cultivo de células en
 1575 suspensión no transformadas posiblemente por variación somoclinal causada por el cultivo
 1576 continuo en medio MS con la adición de reguladores de crecimiento vegetal ANA (1 mg/L). Los
 1577 eventos primarios controlados por reguladores del crecimiento vegetal aplicados exógenamente
 1578 desencadenan la morfogénesis a través de la alteración del ciclo celular que podría inducir
 1579 variabilidad en el cultivo celular (Peschke y Phillips 1992). Se ha demostrado que las auxinas
 1580 utilizadas en cultivos de callos o células en suspensión incrementan la variación genética al
 1581 aumentar la tasa de metilación del ADN (Loschiavo et al. 1989). El uso de ANA (1.0 – 5.0 mg/L)
 1582 en la regeneración de *Sinningia speciosa* a partir de explantes de hojas, mostraron variación
 1583 fenotípica entre el tipo silvestre que muestra una filotaxis opuesta y las plantas regeneradas que
 1584 muestran filotaxis verticilada tricusado (Xu et al., 2009). Las variantes del color de las hojas
 1585 observadas en los somaclones de *Caladium* variaron más con el tipo de auxina que con la
 1586 concentración de auxinas específicas. Usando la misma concentración molar de diferentes auxinas,
 1587 el número de variantes fue mayor en medios que contenían 2,4,5-T (ácido 2, 4, 5-
 1588 triclorofenoxiacético) o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) que con ácido indol butírico (AIB)
 1589 o ANA (Ahmed et al. 2004). Aunque se ha estudiado ampliamente, las causas de variación
 1590 somaclonal siguen siendo en gran parte teóricas o desconocidas (Skirvin et al. 1993; 1994).

1591
 1592 **Tabla 10.** Producción de escopoletina y ácido sphaerálcico en cultivos de suspensiones celulares
 1593 de *S. angustifolia*

Tratamiento	Rendimiento mg/g PS			
	Escopoletina		Ácido sphaerálcico	
	Semana 2	Semana 3	Semana 2	Semana 3
Sa H3.1 sin hormonas	ND	ND	0.19±0.01	0.16±0.05
Sa H3.1 con hormonas	ND	ND	0.39±0.11	0.38±0.04*
Suspensión no transformada	ND	ND	ND	ND

1594 Los valores son la media ± desviación estándar (n=3). De acuerdo con el ANOVA y prueba de Tukey, las medias
 1595 con ** fueron significativamente diferentes: Ácido sphaerálcico Semana 3 F=9.96; * $p < 0.03$; Tukey_{0.05}= 0.18
 1596 ND: No Detectado

Objetivo 3: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1598 **7.4.2 Efecto de la concentración de ANA sobre la producción de escopoletina y ácido**
 1599 **sphaerálcico en cultivos de células en suspensión transformadas de *S. angustifolia***

1600 El mayor índice de crecimiento de las de células cultivadas con diferentes concentraciones de ANA
 1601 (1, 2 y 4 mg/L) se determinó a las 2 semanas de cultivo (**Tabla 11**), no se determinaron diferencias
 1602 significativas en el crecimiento de los cultivos de células en suspensión.

1603 La producción de escopoletina fue similar en las tres concentraciones de ANA utilizadas;
 1604 contenidos que disminuyeron con el tiempo de cultivo. Estos rendimientos son inferiores a lo
 1605 reportado (0.4 mg/g PS) en cultivos con restricción de nitratos (2.74 mM) por Nicasio-Torres et al.
 1606 (2016).

1607
 1608 **Tabla 11.** Índice de crecimiento de células en suspensión transformadas de *Sphaeralcea*
 1609 *angustifolia* cultivadas con diferentes concentraciones de ANA.

Tratamiento ANA en g/L	Índice de crecimiento			
	Peso inicial (g)	1 semana	2 semanas	3 semanas
1	0.1509±0.01	4.7±0.41	7.8±0.7	6.4±0.04
2	0.1509±0.01	4.8±0.76	7.4±0.05	6.7±0.2
4	0.1509±0.01	4.6±0.07	7.5±0.08	6.4±0.3

1610 Los valores son la media ± desviación estándar (n=3).

1611
 1612 Las células en suspensión cultivadas en medio MS con la adición de ANA produjeron escopoletina
 1613 y ácido sphaerálcico (**Tabla 12**). Los rendimientos más altos de escopoletina y de ácido
 1614 sphaerálcico se obtuvieron en la primera semana de cultivo en las 3 concentraciones de ANA
 1615 empleadas, y disminuyeron con el tiempo de cultivo. A las 2 y 3 semanas en cultivo, los contenidos
 1616 mayores de escopoletina se obtuvieron con 2 y 4 mg/L, respectivamente; en tanto que los mayores
 1617 contenidos de ácido sphaerálcico se obtuvieron con la adición de 4 mg/L de ANA al medio de
 1618 cultivo de la suspensión celular.

1619

Objetivo 3: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1620 **Tabla 12.** Producción de escopoletina y ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión
1621 transformadas por *A. rhizogenes* cultivadas con diferentes concentraciones de ANA.

Tratamiento	Escopoletina (mg/g PS)			Ácido sphaerálcico (mg/g PS)		
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Sa H3.1 sin Hormonas		ND	ND		0.19±0.01	0.16±0.05
1 mg/L ANA	0.016±0.001	0.008±0.0005	0.007±0.001	0.34±0.007	0.12±0.01	0.1±0.01
2 mg/L ANA	0.017±0.001	0.01±0.0002*	0.008±0.0001	0.36±0.04	0.15±0.02	0.15±0.02
4 mg/L ANA	0.015±0.001	0.007±0.0004	0.01±0.0003*	0.4±0.03	0.2±0.003*	0.21±0.003*

1622 Los valores son las medias ± desviación estándar (n=3). De acuerdo con el ANOVA y prueba de Tukey, las medias
1623 con ** fueron significativamente diferentes: Escopoletina Semana 2 F=11.43; **p* < 0.009; Tukey_{0.05}= 0.002; Semana
1624 3 F=7.25; **p* < 0.02; Tukey_{0.05} 0.002; Ácido sphaerálcico Semana 2 F=7.67; **p* < 0.02; Tukey_{0.05}= 0.05; Semana 3 F
1625 =22.59; **p* < 0.001; Tukey_{0.05} 0.05. ND: No Detectado

1626
1627 Los contenidos de escopoletina y ácido sphaerálcico en el medio de cultivo se detectaron también
1628 en mayor concentración en la primera semana de cultivo, contenido que se incrementó al acrecentar
1629 la concentración de ANA (**Tabla 13**). El rendimiento de escopoletina es similar (0.99 mg/L de
1630 medio de cultivo) al reportado por Nicasio-Torres et al. (2016) al día 2 de cultivo, el cual fue
1631 disminuyendo en los días subsecuentes. Para el ácido sphaerálcico el mayor contenido también fue
1632 determinado a la semana 1 de cultivo (1.7 mg/L de medio de cultivo) en el tratamiento de 4 mg/L
1633 de ANA, 7 veces superior a lo reportado por Nicasio-Torres et al. (2016).

1634
1635 **Tabla 13.** Rendimiento de la excreción de ácido sphaerálcico y escopoletina al medio de cultivo
1636 de células en suspensión de *S. angustifolia*.

Tratamiento	Escopoletina (mg/L MS)			Ácido sphaerálcico (mg/L MS)		
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 1	Semana 2	Semana 3
1 mg/L ANA	0.1±0.02	0.02±0.005	ND	0.24±0.1	0.15±0.08	ND
2 mg/L ANA	0.54±0.4	0.13±0.1	ND	0.63±0.5	0.11±0.06	ND
4 mg/L ANA	1.1±0.15	0.001±0.007	ND	1.7±0.22*	0.07±0.01	ND

1637 Los valores son las medias ± desviación estándar (n=3)
1638 De acuerdo con el ANOVA y prueba de Tukey las medias con ** fueron significativamente diferentes
1639 Ácido sphaerálcico Semana 1 F=5.93; *p* < 0.03; Tukey_{0.05}= 1.37.

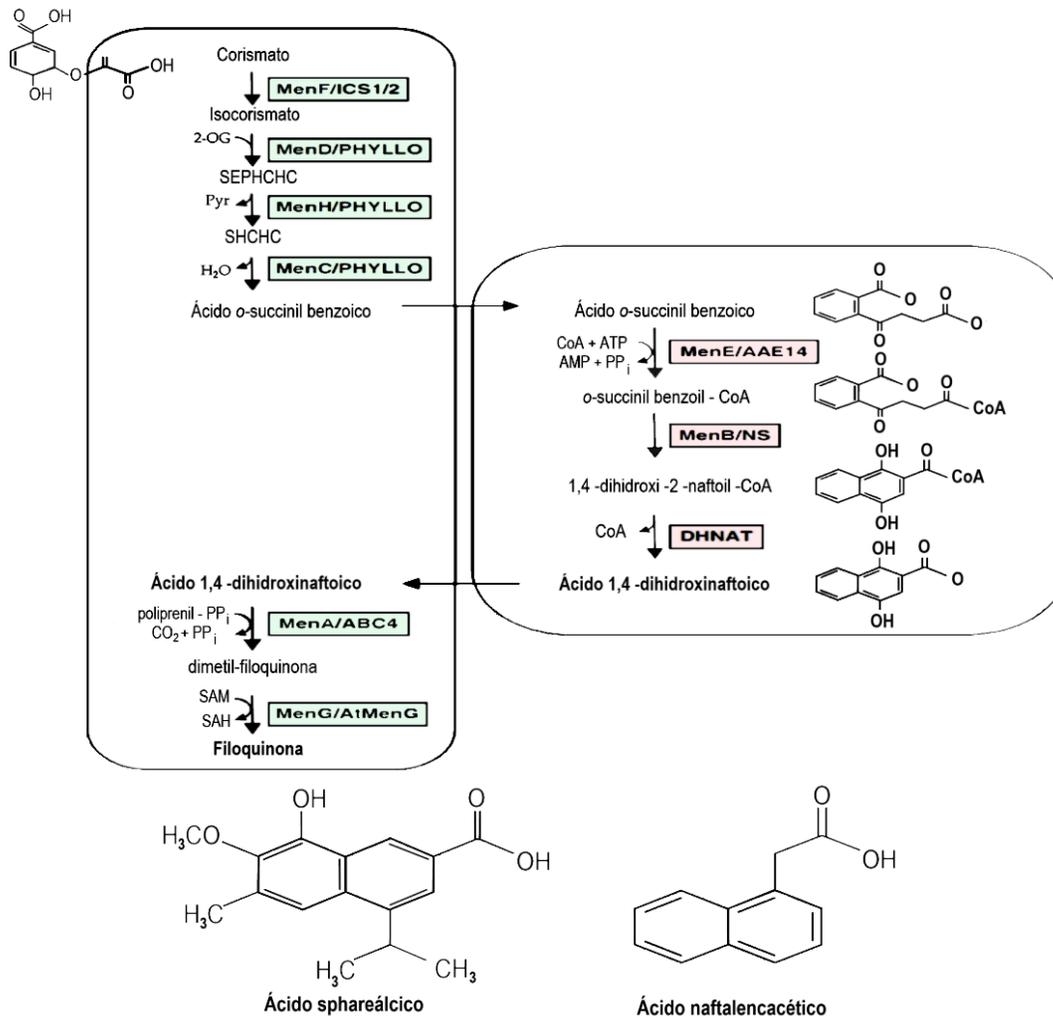
Objetivo 3: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1640 Diversos factores físicos y químicos influyen en el crecimiento celular y la biosíntesis de
1641 metabolitos secundarios en cultivos de tejidos vegetales cuyo mecanismo de su acción no está
1642 completamente esclarecido. Se ha reportado que los reguladores del crecimiento de las plantas y
1643 las condiciones de luz juegan un papel importante. Por ejemplo, el uso de auxinas como ácido 2,4-
1644 D, ANA, AIB y ácido indolacético (AIA) incrementaron la acumulación de escopoletina en el
1645 cultivo en suspensión de *Angelica archangelica* L. cultivada en oscuridad y bajo iluminación
1646 permanente (3500 lux), el mayor contenido de escopoletina se obtuvo con el uso de ANA en una
1647 concentración de 20 mg/L en cultivo con luz (Siatka y Kasparová, 2008).

1648 El ácido sphaerálcico es un derivado del ácido naftoico procedente de las rutas biosintéticas del
1649 ácido shikimico y ácido mevalónico. A partir de la vía del ácido shikimico se obtiene el ácido *p*-
1650 hidroxibenzoico; posteriormente, cadenas de unidades de isopreno obtenidas de la vía del ácido
1651 mevalónico se unen al ácido *p*-hidroxibenzoico para producir una variedad de derivados del ácido
1652 naftoico (Pérez-Hernández, 2014) como el ácido 1,4-dihidroxinaftoico. Se ha reportado que el
1653 ácido 1,4-dihidroxinaftoico es un precursor en la ruta metabólica de síntesis de la vitamina K1,
1654 además el ácido 1,4-dihidroxinaftoico induce apoptosis en queratinocitos de humanos, teniendo
1655 una aplicación potencial para el tratamiento de la psoriasis (Mok et al., 2013). Con base a la
1656 similitud estructural de ANA y el ácido 1,4-dihidroxinaftoico, se postula que ANA podría actuar
1657 como precursor en la biosíntesis del ácido sphaerálcico debido a la similitud en su estructura
1658 química (**Figura 11**).

1659

Objetivo 3: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.



1660

1661 **Figura 11.** Biosíntesis del ácido 1,4 dihidroxy-2 naftoico y estructuras químicas del ácido sphaerálcico y
 1662 ácido naftalencacético.

1663

Objetivo 3: Seleccionar y establecer cultivos de líneas de raíces transformadas de *S. angustifolia* productoras de los compuestos antiinflamatorios escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico mediante el análisis por HPLC de los extractos diclorometano: metanol (9:1) de las raíces transformadas.

1664 **Perspectiva de objetivo.**

1665 Continuando con el estudio del efecto de ANA sobre la producción de ácido sphaerálcico en el
1666 cultivo de células en suspensión transformadas, será necesario explorar la adición de
1667 concentraciones más altas (10, 15 y 20 mg/L) de esta hormona vegetal para determinar si hay un
1668 incremento significativo en la acumulación y/o excreción de ácido sphaerálcico.

1669
1670 Con el propósito de incrementar los rendimientos en la producción de los compuestos activos
1671 (escopoletina y ácido sphaerálcico) se propone evaluar la adición de cobre al medio de cultivo y/o
1672 restricción de nitratos totales reportados como óptimo en las células en suspensión no
1673 transformadas.

1674
1675 Para optimizar el crecimiento del cultivo de células transformadas en suspensión, aumentando la
1676 producción de biomasa y mejorar los rendimientos de escopoletina y ácido sphaerálcico, se propone
1677 realizar un diseño experimental modificando las concentraciones de sacarosa y la agitación (rpm)
1678 en el cultivo.

1679
1680 Realizar cinéticas de crecimiento en lote del cultivo de células en suspensión para identificar la
1681 fase de crecimiento exponencial y evaluar el efecto de metil jasmonato para estimular la producción
1682 de la fitoalexina escopoletina.

1683
1684 Realizar un diseño experimental para determinar la concentración y tiempo de exposición óptimos
1685 del extracto para incrementar la producción de escopoletina en el cultivo de células en suspensión
1686 transformadas.

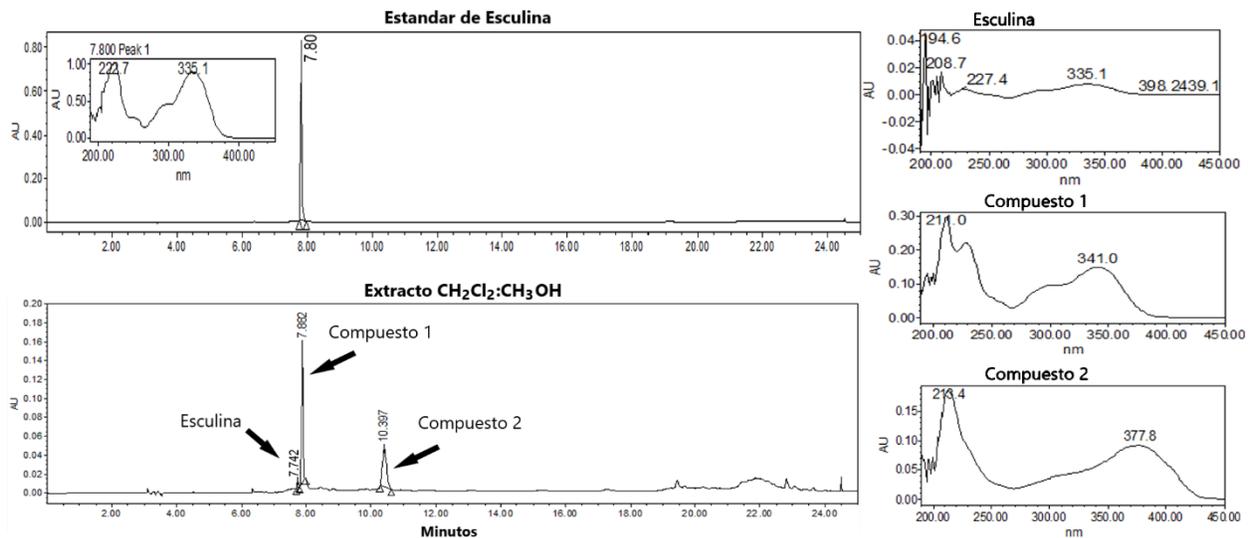
1687

Objetivo 4 Aislar e identificar los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión transformadas de *Sphaeralcea angustifolia*.

1688 **7.5 Identificación de compuestos por HPLC en el extracto CH₂Cl₂:CH₃OH del cultivo de**
1689 **células en suspensión transformadas de *S. angustifolia***

1690 Por medio del análisis por HPLC del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de células en suspensión
1691 transformadas se identificó la presencia de esculina con un tiempo de retención 7.74 min y longitud
1692 de onda de absorción máxima de $\lambda=335$ nm similares al del estándar de esculina (Figura 10).
1693 Además, se observó la presencia de otros 2 compuestos mayoritarios durante un barrido de luz
1694 UV/Vis, un compuesto (1) tiempo de retención de 7.84 min y absorción máxima de $\lambda=341$ nm y el
1695 segundo compuesto (2) con tiempo de retención de 10.39 min y máxima absorción a $\lambda=377.8$ nm
1696 (Figura 12).

1697

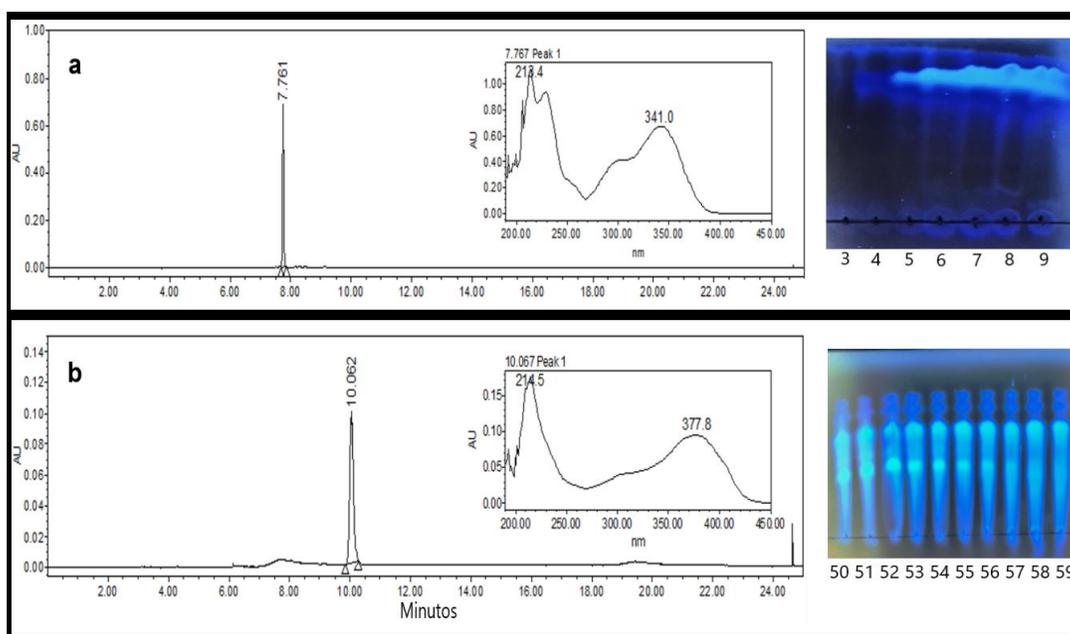


1698 **Figura 12.** Cromatogramas y espectros de absorción de esculina y de compuestos mayoritarios detectados
1699 en el extracto CH₂Cl:CH₃OH obtenido de las células en suspensión transformadas de *S. angustifolia*.
1700

1701
1702 Del fraccionamiento en cromatografía en columna abierta del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de las
1703 células en suspensión transformadas, con base al perfil por cromatografía en capa fina (CCF) y de
1704 HPLC, los compuestos 1 y 2 se aislaron de las reuniones 3 y 9, respectivamente (Figura 13).

1705

Objetivo 4 Aislar e identificar los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión transformadas de *Sphaeralcea angustifolia*.



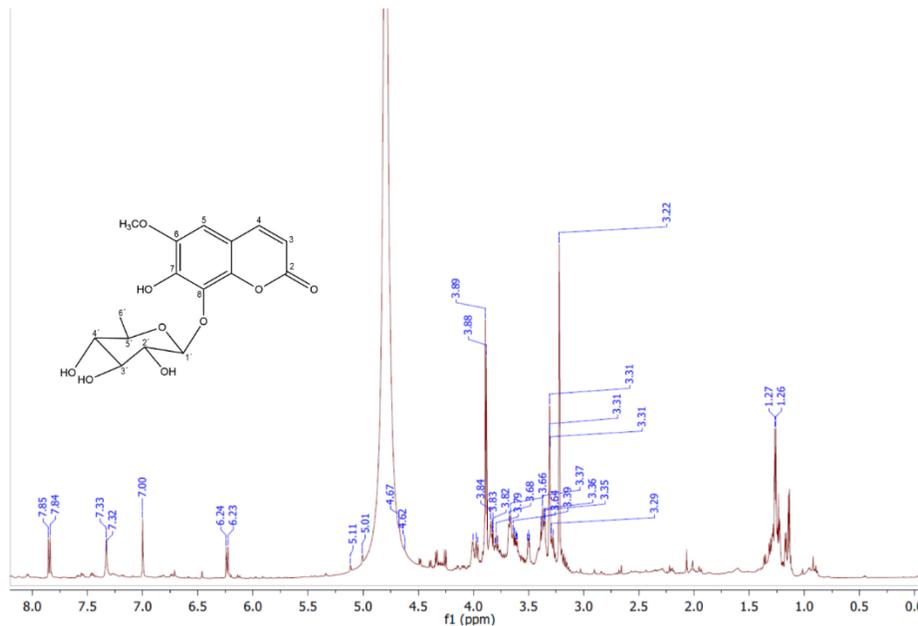
1706
1707 **Figura 13.** Cromatogramas de HPLC y CCF de los compuestos **1** y **2**. **a)** **1** reunión 3 (alícuotas 5 - 9) y **b)**
1708 **2** reunión 9 (alícuotas 50 - 56) aislados del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de células transformadas en suspensión
1709 de *S. angustifolia*.

1710
1711 **7.5.1 Identificación química de los compuestos 1 y 2 presentes en el extrado CH₂Cl₂:CH₃OH**
1712 El compuesto **1**, se obtuvo como un precipitado de coloración amarilla. El análisis del espectro de
1713 Resonancia Magnética Nuclear de ¹H (**Figura 14**) se observan dos señales dobletes asignadas a
1714 dobles enlaces en δ 6.23 y 7.84 con constante de acoplamiento de 9.4 Hz (Tabla 14), lo que indica
1715 que se encuentran en posición de tipo *cis* y son asignados a H-3 y H-4 de un ciclohexeno α, β-
1716 insaturado por el acoplamiento observado a dos y tres ligaduras (HMBC) con el carbonilo en δ
1717 163.2 (C-2). Adicionalmente, en δ 7.0 hay otra señal singulete que corresponde a un hidrogeno de
1718 un anillo aromático y que denota que se encuentra penta sustituido, con grupos que contienen bases
1719 de oxígeno por sus desplazamientos químicos en δ 147.8, 148.8 y 137.2, que son asignados a C-6,
1720 C-7 y C-8, respectivamente (**Tabla 14**). De acuerdo con el análisis de RMN de ¹H y ¹³C se
1721 determina que el esqueleto de este compuesto corresponde a 6,7,8-trihidroxicumarina (**Figura 15**).
1722 En RMN de protón se observan señales características de carbonos unidos a oxígenos; una señal
1723 singulete en δ 3.89 que integra para tres protones, que correspondería a un metoxilo y que esta
1724 señal (δ3.89) esta correlacionando (HMBC) con la señal de carbono en δ 147.8, por lo que indico

Objetivo 4 Aislar e identificar los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión transformadas de *Sphaeralcea angustifolia*.

1725 que este grupo se encuentra unido en posición C-6 del anillo aromático; también una señal doblete
1726 característica de protón anomérico en δ 4.64 con una constante de acoplamiento de 7.7 Hz.

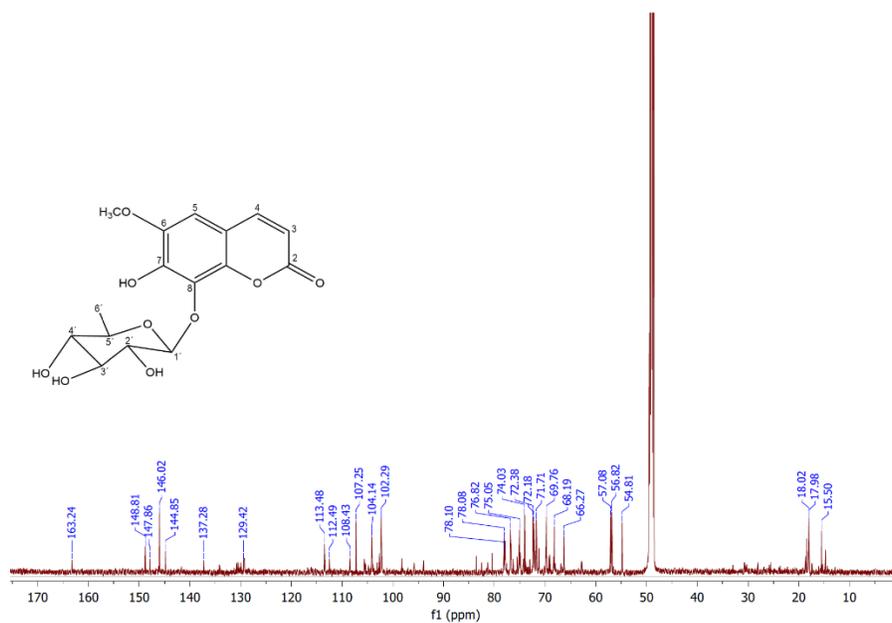
1727



1728

1729 **Figura 14.** Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 600 MHz) de 8-O-ramnósido de Fraxetina (compuesto 1).

1730



1731

1732 **Figura 15.** Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 150 MHz) de 8-O-ramnósido de fraxetina (compuesto 1).

Objetivo 4 Aislar e identificar los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión transformadas de *Sphaeralcea angustifolia*.

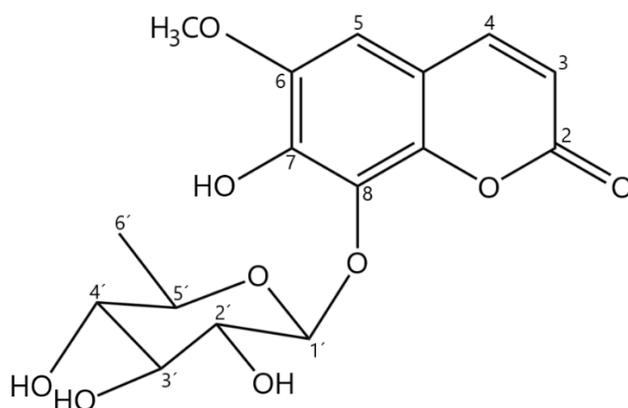
1733 El análisis de RMN de los experimentos COSY y HSQC permitió determinar que el azúcar
 1734 corresponde a una hexosa conocida como ramnosa, esto se logró establecer por la presencia de una
 1735 señal observada a campo bajo de δ 1.26 que integra para 3 protones correspondiente a un grupo
 1736 metilo y que es acoplado con H-5 (δ 3.8) del azúcar, por lo que este monosacárido corresponde a
 1737 la ramnopiranos. La señal de H-1 (δ 4.64, d, 7.7Hz), correlaciona en HMBC con la señal de
 1738 carbono en δ 137.2 por lo que se determina que el azúcar se encuentra unido en C-8 del anillo
 1739 aromático. El análisis de los experimentos de una y dos dimensiones de RMN y la comparación
 1740 con los datos descritos en la literatura (Owczarek et al., 2019), permitió determinar que es un
 1741 derivado de fraxetina (**Figura 16**), conocido como 8-O-ramnósido de fraxetina (**1**).

1742
 1743 **Tabla 14.** Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de 8-O-ramnósido de fraxetina (compuesto **1**, 600 y 150
 1744 MHz, CD_3OD) y comparación con la literatura.

Posición	δ_{H}	δ_{C}	Owczarek et al., 2019
			FRAXINA δ_{H}
2		163.2	
3	6.23 (1H, d, J = 9.4)	113.4	6.28 (1H, d, J = 9.4)
4	7.84(1H, d, J = 9.4)	146.0	7.90 (1H, d, J = 9.4)
5	7.0 (1H, s)	107.2	7.01 (1H, s)
6		147.8	3.93 (3H, s) – CH ₃
7		148.8	
8		137.2	
9		144.8	
10		112.4	
6 -OCH ₃	3.89(3H, s)	56.8	
Ramnósido			
1'	4.64 (1H, d, J = 7.7)	102.2	5.00 (1H, d, J = 7.9)
2'	4.36 (1H, m)	72.1	3.60 (1H, d, J = 7.9, 9.4)
3'	4.19 (1H, m)	72.3	3.51 – 3,47 (2H, m)
4'	3.90 (1H, m)	74.0	~3.26 – obscured by residual methanol signal
5'	3.68 (1H, m)	69.7	3.51- 3.4 (2H, m)
6'	1.26, d (6.2)	18.0	3.82 (1H, dd, J = 2.3, 12.1) 3.73 (1H, dd, J = 4.9, 12.1)

1745

Objetivo 4 Aislar e identificar los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión transformadas de *Sphaeralcea angustifolia*.



1746

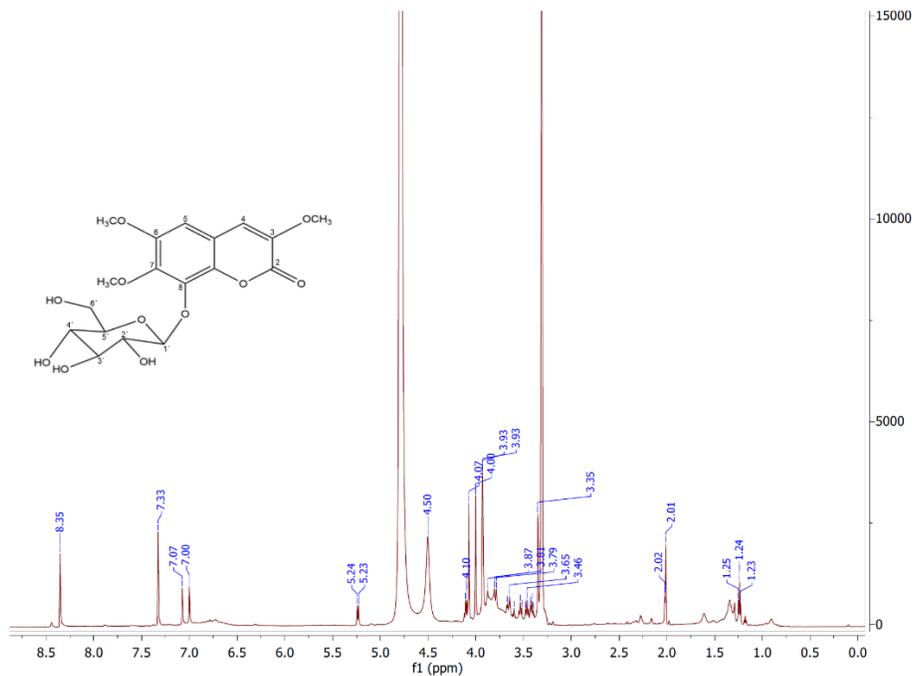
1747 **Figura 16.** Estructura química de 8-*O*-ramnósido de fraxetina (**1**)

1748

1749 El compuesto **2** se obtuvo de la reunión **9**, precipitó con metanol (MeOH) y mostro una coloración
1750 amarilla. El espectro de RMN de ^1H mostro dos señales singuletes característico de un anillo
1751 aromático en δ 7.0 y un doble enlace en δ 7.33 e integran para un solo protón, definiéndose que el
1752 del anillo aromático está penta sustituido (**Figura 17**). Los datos espectroscópicos fueron similar
1753 al compuesto **1**, por lo que nos indicó la presencia de una cumarina de tipo fraxetina, que se
1754 encuentra trimetoxilada por la presencia de tres señales singuletes observadas en δ 4.07, 4.0 y 3.93
1755 (**Tabla 15**) que integra para tres protones y en el carbono mostraron desplazamientos en δ 57.2,
1756 57.0 y 61.7 que son asignados a C-3 (OCH₃), C-6 (OCH₃) y 7 (OCH₃) respectivamente (**Figura**
1757 **18**). Se observa en protón una señal doblete característica de protón anomérico en δ 5.23 con una
1758 constante de acoplamiento de 7.6 Hz. El análisis de RMN de los experimentos COSY y HSQC
1759 permitió determinar que el azúcar corresponde a una hexosa conocida como glucopiranososa. La
1760 señal de H-1 (δ 5.23, d, 7.6Hz), correlaciona en HMBC con la señal de carbono en δ 136.5 por lo
1761 que se determina que el azúcar se encuentra unido en C-8 del anillo aromático. El análisis de los
1762 experimentos de una y dos dimensiones de RMN y la comparación con los datos descritos en la
1763 literatura (Owczarek et al., 2019), se propone que este compuesto es un derivado de fraxetina
1764 (**Figura 19**), conocido como 8-*O*-glucopiranosido de 3,6,7-trimetoxicumarina (**2**).

Objetivo 4 Aislar e identificar los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión transformadas de *Sphaeralcea angustifolia*.

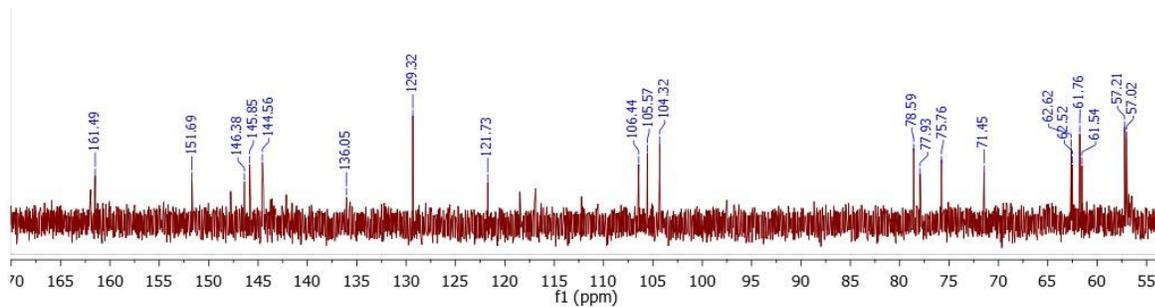
1765



1766

1767 **Figura 17.** Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 600 MHz) 8-*O*-glucopiranosido de 3,6,7-
1768 trimetoxicumarina (2).

1769



1770

1771 **Figura 18.** Espectro de RMN de ¹³C (CD₃OD, 150 MHz) de 8-*O*-glucopiranosido de 3,6,7-
1772 trimetoxicumarina (2).

1773

1774

1775

1776

1777

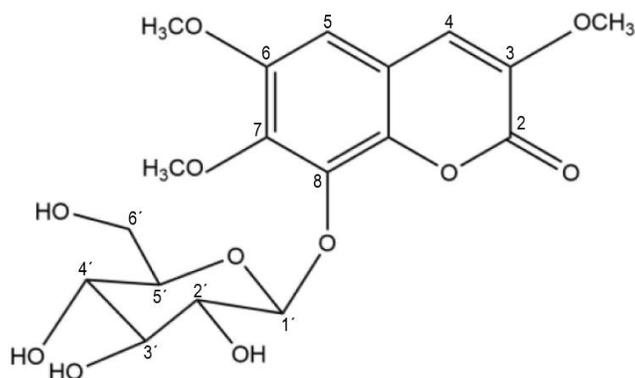
Objetivo 4 Aislar e identificar los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión transformadas de *Sphaeralcea angustifolia*.

1778 **Tabla 15.** Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de 8-O-glucopiranosido de 3,6,7-trimetoxicumarina
 1779 correspondiente al compuesto **2** (600 y 150 MHz, CD_3OD).

Número	δ_{H} (2)	δ_{C} (2)
2		161.4
3		144.5
4	7.33(1H, s)	129.3
5	7.0 (1H, s)	105.5
6		151.6
7		146.3
8		136.0
9		145.8
10		106.4
3 -OCH ₃	3.93 (3H, s)	57.2
6 -OCH ₃	3.93(3H, s)	57.0
7 -OCH ₃	4.07 (3H,s)	61.7
Glucósido		
1'	5.23 (1H, d, J = 7.6)	104.3
2'	3.52 (1H, dd, 7.4, 8.0 Hz)	75.7
3'	3.46 (1H, dd, 8.8, 9.0 Hz)	77.9
4'	3.41 (1H, dd, 8.8, 9.0 Hz)	71.4
5'	3.27 (1H, m)	78.5
6'a	3.80 (1H, d (ancho,12 Hz)	61.5
b	3.66 (1H, d (ancho,12.4 Hz)	

1780

1781



1782

1783 **Figura 19.** Estructura química de 8-O-glucopiranosido de 3,6,7-trimetoxicumarina (**2**)

1784

Objetivo 4 Aislar e identificar los compuestos producidos en el cultivo de células en suspensión transformadas de *Sphaeralcea angustifolia*.

1785 **Perspectivas de Objetivo.**

1786

1787 Optimizar el método de extracción y purificación de los compuestos identificados en el extracto

1788 CH₂Cl₂:CH₃OH que permitan su cuantificación y evaluación biológica.

1789

1790 Evaluar los compuestos aislados del extracto de células en suspensión transformadas en el modelo

1791 de úlceras inducidas con etanol absoluto en ratón y determinar si los compuestos son los

1792 responsables de la actividad gastroprotectora.

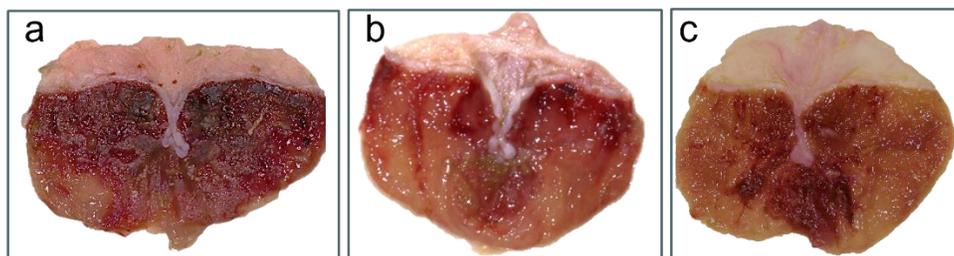
1793

Objetivo 5 Evaluar el efecto antiulcerogénico del extracto diclorometano: metanol (9:1) de células en suspensión transformadas de *S. angustifolia*, en un modelo de úlceras gástricas inducidas por etanol absoluto en ratón.

1794 **7.6 Efecto del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de células en suspensión transformadas de *S.***
 1795 ***angustifolia* en un modelo de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto en ratón**

1796 Las úlceras pépticas se caracterizan por erosiones en la mucosa del tracto gastrointestinal que
 1797 pueden llegar a la capa muscular, este daño fue más evidente en los ratones a los que se administró
 1798 el vehículo (Agua destilada; Figura 20), los estómagos de los ratones de este grupo presentaron un
 1799 promedio de índice de ulceración de 0.6. Los ratones tratados con omeprazol (25 mg/kg) y extracto
 1800 CH₂Cl₂:CH₃OH (100 mg/kg) de células en suspensión transformadas presentaron áreas del
 1801 estómago menos dañadas y los índices de úlceras fueron significativamente diferentes de acuerdo
 1802 con el ANOVA y prueba de Dunnett con respecto al control (Tabla 16); sin embargo, no hubo
 1803 diferencia significativa en el efecto gastroprotector entre el omeprazol y el extracto.

1804



1805

1806 **Figura 20.** Fotografías de estómago de ratón después de inducir las úlceras con etanol. **a)** Vehículo (agua
 1807 destilada), **b)** Omeprazol, **c)** extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de células en suspensión transformadas de *S.*
 1808 *angustifolia*.

1809

1810 **Tabla 16.** Efecto del extracto de células en suspensión transformadas en un modelo de úlcera
 1811 gástrica inducida por etanol absoluto en ratón.

Tratamiento	Dosis	Área lesionada mm ²	Índice de ulceración	Gastroprotección (%)
Vehículo	0.012 mL/g	176.11 ± 49	0.6 ± 0.0763	---
Omeprazol	20 mg/kg	18.38 ± 16	0.08 ± 0.06***	86.66 ± 12.36
Extracto CH ₂ CL ₂ :CH ₃ OH SaH3.1	100 mg/kg	32.36 ± 5	0.11 ± 0.028***	82.01 ± 3.42

1812 Los valores son las medias ± desviación estándar. (n=4). De acuerdo con análisis *t student*, las medias con ***
 1813 fueron significativamente diferentes. Índice de ulceración $p < 0.05$.

Objetivo 5 Evaluar el efecto antiulcerogénico del extracto diclorometano: metanol (9:1) de células en suspensión transformadas de *S. angustifolia*, en un modelo de úlceras gástricas inducidas por etanol absoluto en ratón.

1814 Omeprazol fue el primer inhibidor de la bomba de protones H^+/K^+ -ATPasa en las células parietales
1815 de la mucosa gástrica utilizado clínicamente para reducir la secreción de ácido en el estómago y
1816 lleva en uso más de 25 años (Olbe et al., 2003; Strand y Peura, 2017). El omeprazol generalmente
1817 se administra bajo un recubrimiento entérico que permite su liberación en el estómago; tiene efecto
1818 citoprotector que puede reforzar y proteger la mucosa gástrica (Lopes-de-Campos et al., 2021).

1819 En estudios previos con plantas productoras de escopoletina se ha reportado que la escopoletina
1820 inhibe la formación de úlceras en un 82.25% y en un 81.42% en modelos de úlceras inducido por
1821 etanol y serotonina, respectivamente. La escopoletina elimina radicales libres de oxígeno,
1822 compuestos peroxinitritos y controla los niveles de serotonina; además, se especula que la
1823 escopoletina puede reducir la secreción de ácido gástrico a través de la supresión de la bomba de
1824 protones (Mahattanadul et al., 2011).

1825 Por otra parte, escopoletina y otras cumarinas son reconocidas como inhibidores enzimáticos de
1826 las enzimas lipoxigenasa (leucotrienos) y la ciclooxigenasa (prostaglandinas) mediadoras en la
1827 generación de sustancias que promueven la inflamación. Asimismo, inhiben la generación de
1828 aniones superóxido dependientes de neutrófilos (Fylaktakidou et al., 2004). Aunado a esto, el
1829 efecto antiinflamatorio e inmunomodulador de citocinas pro y antiinflamatorias del ácido
1830 sphaerálcico pueden ser los compuestos responsables del efecto gastroprotector demostrado en el
1831 extracto $CH_2Cl_2:CH_3OH$ entre otros.

Objetivo 5 Evaluar el efecto antiulcerogénico del extracto diclorometano: metanol (9:1) de células en suspensión transformadas de *S. angustifolia*, en un modelo de úlceras gástricas inducidas por etanol absoluto en ratón.

1832 **Perspectivas de Objetivo.**

1833 Evaluar el efecto antiinflamatorio de los compuestos aislados del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH en un
1834 modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA

1835
1836 Evaluar el efecto antiinflamatorio e inmunomodulador de los compuestos aislados del extracto de
1837 células en suspensión en un modelo de artritis inducido por caolin/ λ -carragenina.

1838

1839

1840 **8. Conclusión General**

1841 Con el proceso de transformación establecido a través de la infección de nodos y hojas de *S.*
1842 *angustifolia* con *A. rhizogenes* ATCC 15834/pTDT, fue posible establecer siete líneas de raíces
1843 transformadas (SaTR N5.1, SaTR N7.1, SaTR N7.2, SaTR N12.2, SaTR N12.4, SaTR N15.1 y
1844 SaTR H2.2) de *S. angustifolia*. Cuatro de estas líneas son productoras de escopoletina y ácido
1845 sphaerálcico, ambos compuestos son acumulados y excretados al medio de cultivo.

1846 La línea SaTR N5.1 tuvo el mejor crecimiento, lo que permitirá evaluar diferentes estrategias para
1847 incrementar la producción de escopoletina y/o ácido sphaerálcico.

1848 La línea SaTR N7.2 fue altamente productora de ácido sphaerálcico y escopoletina condición que
1849 afectó negativamente su crecimiento. Esta línea segrega ácido sphaerálcico al medio de cultivo,
1850 condición que puede facilitar su purificación e implementar un sistema de producción continua de
1851 este compuesto en biorreactor.

1852 Las líneas SaTR N12.2 y SaTR N12.4 son productoras de otros metabolitos secundarios aún no
1853 identificados en las suspensiones celulares ni en las plantas silvestres de *S. angustifolia*. Será
1854 importante dar continuidad al estudio químico-biológico de estos compuestos.

1855 El cultivo de células en suspensión establecido a partir del callo generado en un explante de hoja
1856 infectado por *A. rhizogenes*, mantuvo un crecimiento continuo en medio libre de reguladores de
1857 crecimiento vegetal y tiene la capacidad de acumular ácido sphaerálcico. En este cultivo sería
1858 posible investigar la biosíntesis del ácido sphaerálcico mediante análisis metabolómicos y
1859 secuenciación de ARN (RNAseq).

1860 La adición de ANA al medio de cultivo de células transformadas en suspensión, cuya estructura
1861 química es similar al del ácido sphaerálcico, incrementó la producción de ácido sphaerálcico y
1862 escopoletina, asimismo favoreció la excreción de los compuestos al medio de cultivo. De esta
1863 manera, se propone adicionar ANA a concentraciones más altas de las utilizadas, para corroborar
1864 si hay una correlación con el incremento de la producción de ácido sphaerálcico.

1865 Se demostró un efecto gastroprotector del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH del cultivo de células
1866 transformadas en suspensión en el modelo de ulcera inducida por etanol absoluto en ratón. Sería
1867 conveniente profundizar los estudios farmacológicos sobre esta actividad en el extracto. Además,
1868 será importante corroborar si los compuestos derivados de fraxetina **1** y **2** aislados del extracto
1869 CH₂Cl₂:CH₃OH del cultivo de células transformadas en suspensión, tienen un efecto
1870 gastroprotector en el modelo de úlceras inducidas con etanol absoluto en ratón.

1871 9. Referencias

- 1872 Aguilar A, et al. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Publicación del IMSS. México D.F; 1994.
1873 140-251
- 1874 Ahmed, E. U., Hayashi, T., & Yazawa, S. (2004). Auxins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium*
1875 regenerated from leaf explants. *Scientia horticulturae*, 100(1-4), 153-159.
- 1876 Aldi, Y., Yuliandra, Y., Nasrul, E., Yanwirasti, Handayani, D., & Bakhtiar, A. (2015). Decreased interleukin-4 level of
1877 type I hypersensitive mice using scopolletin isolated from noni fruit (*Morinda citrifolia* L.). *Research Journal*
1878 of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6(4), 1823–1829.
- 1879 Altamura M M. (2004). *Agrobacterium rhizogenes* rolB and rolD genes: regulation and involvement in plant
1880 development. *Plant cell, tissue, and organ culture*, 77: 89-101.
- 1881 Arreguín S ML, et al. (1997). Introducción a la Flora del Estado de Querétaro. Queretaro: Consejo de Ciencia y
1882 Tecnología del estado de Queretaro; 361.
- 1883 Argueta V, A; Cano A, L.; Rodarte, M. L. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México:
1884 Instituto Nacional Indigenista, p. 44-52.
- 1885 Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R., & Jha, S. (2019). A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their
1886 associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnology Advances*, 37(7), 107405.
- 1887 Bais, H. P., Suresh, B., Raghavarao, K. S. M. S., & Ravishankar, G. A. (2002). Performance of hairy root cultures of
1888 *Cichorium intybus* L. in bioreactors of different configurations. *In Vitro Cellular and Developmental Biology -*
1889 *Plant*, 38(6), 573–580. <https://doi.org/10.1079/IVP2002334>
- 1890 Bakkali, A. T., Jaziri, M., Ishimaru, K., Tanaka, N., Shimomura, K., Yoshimatsu, K., ... & Vanhaelen, M. (1997). Tannin
1891 production in hairy root cultures of *Lawsonia inermis*. *Journal of plant physiology*, 151(4), 505-508.
- 1892 Batra, J., Dutta, A., Singh, D., Kumar, S., & Sen, J. (2004). Growth and terpenoid indole alkaloid production in
1893 *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left- and right-termini-linked Ri T-DNA gene integration.
1894 *Plant Cell Reports*, 23(3), 148–154. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0815-x>
- 1895 Binns A N, Thomashow M F. (1988). Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annual*
1896 *Reviews in Microbiology*, 42: 575-606.
- 1897 Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Lacoux, J., Fliniaux, M. A., & Jacquín-Dubreuil, A. (2000). Tropane alkaloid
1898 production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes*
1899 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rol A, B, C genes only. *Journal of Biotechnology*, 81(2–3),
1900 151–158. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00287-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00287-X)
- 1901 Bosques-Padilla FJ, Remes-Troche JM, Gonzáles-Huezo MS, et al. (2018). IV consenso mexicano sobre *Helicobacter*
1902 *pylori*. *Revista de gastroenterología de México.*; 83(3): 325-341.
- 1903 Bulgakov, V. P., Khodakovskaya, M. V., Labetskaya, N. V., Chernoded, G. K., and Zhuravlev, Y. N. (1998). The impact
1904 of plant rolC oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. *Phytochemistry*, 49(7), 1929-
1905 1934.
- 1906 Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Khodakovskaya, M. V., Glazunov, V. P., Radchenko, S. V., ...
1907 & Zhuravlev, Y. N. (2002). Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on
1908 anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes. *Journal*
1909 *of biotechnology*, 97(3), 213-221.
- 1910 Caili and Meizhe (2021). Application of hairy root culture for bioactive compounds production in medicinal plants.
1911 *Current Pharmaceuticals Biotechnology*, 22, 592-608. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200516155146>
- 1912 Chandra S, Chandra R. 2011. Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry reviews*; 10:
1913 371.
- 1914 Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: Role of T-DNA in plant secondary
1915 metabolism. *Biotechnology Letters*, 34(3), 407–415. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0785-3>
- 1916 Chubineh, S., & Birk, J. (2012). Proton pump inhibitors: the good, the bad, and the unwanted. *South Med J*, 105(11),
1917 613-618.
- 1918 Colling, J., Groenewald, J. H., & Makunga, N. P. (2010). Genetic alterations for increased coumarin production lead to
1919 metabolic changes in the medicinally important *Pelargonium sidoides* DC (Geraniaceae). *Metabolic*
1920 *Engineering*, 12(6), 561–572. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.08.001>
- 1921 Danphitsanuparn, P., Boonsongcheep, P., Boriboonsakset, T., Chintapakorn, Y., & Prathanturarug, S. (2012). Effects of
1922 *Agrobacterium rhizogenes* strains and other parameters on production of isoflavonoids in hairy roots of *Pueraria*
1923 *candollei* Grah. ex Benth. var. *candollei*. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 111(3), 315–322.
1924 <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0196-8>

- 1925 Del Valle, J. (2016). Enfermedad por úlcera péptica y trastornos relacionados. Harrison, principios de medicina interna
 1926 19^a edición (pp. 1911-1932). McGraw Hill Education.
- 1927 Ding, Z., Dai, Y., Hao, H., Pan, R., Yao, X., & Wang, Z. (2008). Anti-inflammatory effects of scopoletin and underlying
 1928 mechanisms. *Pharmaceutical Biology*, 46(12), 854–860. <https://doi.org/10.1080/13880200802367155>
- 1929 Drini, M. (2017). Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Australian prescriber*, 40(3), 91.
- 1930 Estruch J J, Parets-Soler A, Schmülling T, Spena A. (1991). Cytosolic localization in transgenic plants of the rolC peptide
 1931 from *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant molecular biology*, 17: 547-550.
- 1932 Estruch J J, Parets-Soler A, Schmülling T, Spena A. (1996). Chemically induced expression of the rolC-encoded β -
 1933 glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: rolC does not hydrolyze
 1934 endogenous cytokinin glucosides in planta. *The Plant Journal*, 10: 33-46.
- 1935 Fritz C, Palacios N, Fiel R, Stitt M (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco:
 1936 nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J* 46:533–548
- 1937 Gangopadhyay, M., Dewanjee, S., & Bhattacharya, S. (2011). Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago*
 1938 indica hairy root cultures. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(6), 706-710.
- 1939 García-Rodríguez, R. V., Chamorro Cevallos, G., Siordia, G., Jiménez-Arellanes, M. A., Chávez-Soto, M. A., &
 1940 Meckes-Fischer, M. (2012). *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don extract, a potential phytomedicine to treat
 1941 chronic inflammation. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 11(5), 454–
 1942 463.
- 1943 Gelvin S B. (1990). Crown gall disease and hairy root disease: a sledgehammer and a tackhammer. *Plant Physiology*:
 1944 92: 281-285.
- 1945 Gelvin, S. B. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual review of plant*
 1946 *biology*, 51(1), 223-256.
- 1947 Georgiev, V. G., Bley, T., & Pavlov, A. I. (2013). Bioreactors for the cultivation of red beet hairy roots. In *Red beet*
 1948 *biotechnology* (pp. 251-281). Springer, Boston, MA.
- 1949 Giri A, Ravindra S T, Dhingra V, Narasu M L. (2001). Influence of different strains of *agrobacterium rhizogenes* on
 1950 induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current science*; 378-382.
- 1951 Grzegorzczuk, I., Królicka, A., & Wysokińska, H. (2006). Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for
 1952 the production of rosmarinic acid. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 61(5–6),
 1953 351–356. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-5-609>
- 1954 Guivarc'h A, Carneiro M, Vilaine F, Pautot V, Chriqui D. (1996). Tissue-specific expression of the rolA gene mediates
 1955 morphological changes in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*; 30: 125-134.
- 1956 Gutierrez-Valdes, N., Häkkinen, S. T., Lemasson, C., Guillet, M., Oksman-Caldentey, K. M., Ritala, A., & Cardon, F.
 1957 (2020). Hairy Root Cultures—A Versatile Tool With Multiple Applications. *Frontiers in Plant Science*,
 1958 11(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00033>
- 1959 Guzmán, S., Díaz, R., & González, M. (2017). Plantas medicinales. La realidad de una tradición ancestral. Folleto
 1960 informativo Núm. 1. INIFAP, Celaya, Guanajuato, México.
- 1961 Gwak et al., G. et. (2011). Extraction Procedures for Free Radical Scavenging Activity from Noni Fruit (*Morinda*
 1962 *citrifolia*). *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 19(1), 38–46.
 1963 <https://doi.org/10.7783/KJMCS.2011.19.1.038>
- 1964 Haas, J. H., Moore, L. W., Ream, W., & Manulis, S. (1995). Universal PCR primers for detection of phytopathogenic
 1965 *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2879–2884.
 1966 <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2879-2884.1995>
- 1967 Häkkinen, S. T., Moyano, E., Cusidó, R. M., & Oksman-Caldentey, K. M. (2016). Exploring the metabolic stability of
 1968 engineered hairy roots after 16 years maintenance. *Frontiers in plant science*, 7, 1486.
 1969 <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01486>
- 1970 Hansen, G., Vaubert, D., Clerot, D., and Brevet, J. (1997). Wound-inducible and organ-specific expression of ORF13
 1971 from *Agrobacterium rhizogenes* 8196 T-DNA in transgenic tobacco plants. *Molecular and General Genetics*
 1972 *MGG*, 254(3), 337-343.
- 1973 Hernández M RJ, Polanco S A, Vizcarra A, Guzmán W, González J HJ, Agüero RL. (2008). Manejo de úlcera péptica
 1974 en adultos en primer y segundo niveles de atención. México. Secretaria de Salud.
- 1975 Hosseini, S. M., Bahramnejad, B., Douleti Baneh, H., Emamifar, A., & Goodwin, P. H. (2017). Hairy root culture
 1976 optimization and resveratrol production from *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. *World Journal of Microbiology*
 1977 *and Biotechnology*, 33(4), 1-10.
- 1978 Jain, D. C., Pant, N., Gupta, M. M., Bhakuni, R. S., Verma, R. K., Tandon, S., ... & Kumar, S. (2002). U.S. Patent No.
 1979 6,337,095. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- 1980 Jang, J. H., Park, J. E., & Han, J. S. (2020). Scopoletin increases glucose uptake through activation of PI3K and AMPK
 1981 signaling pathway and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research*, 74, 52–61.
 1982 <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.12.003>
- 1983 Jaziri M, Shimomura K, Yoshimatsu K, Fauconnier M L, Marlier M, Homes J. (1995). Establishment of normal and
 1984 transformed root cultures of *Artemisia annua* L. for artemisinin production. *Journal of plant physiology*, 145:
 1985 175-177.
- 1986 Jimenez - Silva (2017). *Medicina tradicional*. BOLETÍN CONAMED, 4(13).
- 1987 Juárez-Ciriaco M, Román-Ramos R, González-Márquez H, Meckes-Fischer M. (2008). Efecto de *Sphaeralcea*
 1988 *angustifolia* sobre la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias. *LabCiencia con noticias técnicas de*
 1989 *laboratorio*; 2: 21-23.
- 1990 Kai, G., Liao, P., Xu, H., Wang, J., Zhou, C., Zhou, W., ... & Zhang, L. (2012). Molecular mechanism of elicitor-induced
 1991 tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(4), 1421-
 1992 1433.
- 1993 Kastell, A., Smetanska, I., Ulrichs, C., Cai, Z., & Mewis, I. (2013). Effects of phytohormones and jasmonic acid on
 1994 glucosinolate content in hairy root cultures of *Sinapis alba* and *Brassica rapa*. *Applied biochemistry and*
 1995 *biotechnology*, 169(2), 624-635.
- 1996 Lopes-de-Campos, D., Pereira-Leite, C., Fontaine, P., Coutinho, A., Prieto, M., Sarmiento, B., ... & Reis, S. (2021).
 1997 Interface-Mediated Mechanism of Action—The Root of the Cytoprotective Effect of Immediate-Release
 1998 Omeprazole. *Journal of medicinal chemistry*, 64(8), 5171-5184.
- 1999 LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., ... & Terzi, M. (1989). DNA methylation
 2000 of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and
 2001 hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77(3), 325-331.
- 2002 Mallol, A., Cusidó, R. M., Palazón, J., Bonfill, M., Morales, C., & Piñol, M. T. (2001). Ginsenoside production in
 2003 different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. *Phytochemistry*, 57(3), 365-371.
- 2004 Martínez M. (1979). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México, Fondo de Cultura
 2005 Económica,
- 2006 Mazid, M., Khan, T. A., & Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of
 2007 plants. *Biology and medicine*, 3(2), 232-249.
- 2008 Mcvaugh, R. (2001). *Flora Novo-Galiciana: a descriptive account of the vascular plants of Western Mexico*. Vol. 3.
 2009 Ochnaceae to Loasaceae. Ann Arbor: University of Michigan Herbarium, 102.
- 2010 Meckes, M., David-Rivera, A. D., Nava-Aguilar, V., & Jimenez, A. (2004). Activity of some Mexican medicinal plant
 2011 extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine*, 11(5), 446–451.
 2012 <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.06.002>
- 2013 Mei X, Xu D, Xu S, et al. (2012). Novel role of Zn (II)–curcumin in enhancing cell proliferation and adjusting
 2014 proinflammatory cytokine mediated oxidative damage of ethanol-induced acute gastric ulcers. *Chemico-Biol*
 2015 *Interact*; 197: 31–39.
- 2016 Minh, T. N., Xuan, T. D., Tran, H. D., Van, T. M., Andriana, Y., Khanh, T. D., Van Quan, N., & Ahmad, A. (2019).
 2017 Isolation and purification of bioactive compounds from the stem bark of *Jatropha podagrica*. *Molecules*, 24(5),
 2018 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules24050889>
- 2019 Mohajjel-Shoja H, Clément B, Perot J, Alioua M, Otten L. (2011). Biological activity of the *Agrobacterium rhizogenes*–
 2020 derived *trlC* gene of *Nicotiana tabacum* and its functional relation to other *plst* Genes. *Molecular plant-*
 2021 *microbe interactions*, 24: 44-53.
- 2022 Moon, P. D., Lee, B. H., Jeong, H. J., An, H. J., Park, S. J., Kim, H. R., Ko, S. G., Um, J. Y., Hong, S. H., & Kim, H.
 2023 M. (2007). Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the
 2024 IκB/NF-κB signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *European Journal of Pharmacology*, 555(2–3),
 2025 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.10.021>
- 2026 Mora-Izquierdo A, Nicasio-Torres MP, Sepu lveda-Jime ´nez G, CruzSosa F (2011) Changes in biomass allocation and
 2027 phenolic compounds accumulation due to the effect of light and nitrate supply in *Cecropia peltata* plants. *Acta*
 2028 *Physiol Plant* 33:2135–2147. doi:10.1007/s11738-011-0753-5
- 2029 Moreno-Anzúrez, N. E., Marquina, S., Alvarez, L., Zamilpa, A., Castillo-España, P., Perea-Arango, I., Torres, P. N.,
 2030 Herrera-Ruiz, M., Díaz García, E. R., García, J. T., & Arellano-García, J. (2017). A cytotoxic and anti-
 2031 inflammatory campesterol derivative from genetically transformed hairy roots of *Lopezia racemosa* Cav.
 2032 (*Onagraceae*). *Molecules*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010118>
- 2033 Moyano, E., Fornalé, S., Palazón, J., Cusidó, R. M., Bonfill, M., Morales, C., and Piñol, M. T. (1999). Effect of
 2034 *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in *Solanaceae* plants. *Phytochemistry*, 52(7), 1287-
 2035 1292.

- 2036 Moyano, E., Fornalé, S., Palazón, J., Cusidó, R. M., Bagni, N., & Piñol, M. T. (2002). Alkaloid production in Duboisia
2037 hybrid hairy root cultures overexpressing the pmt gene. *Phytochemistry*, 59(7), 697-702.
- 2038 Murashige, T., & Skoog, F. (1962). Murashige1962Revised.Pdf. *Physiologia Plantarum*, 15, 474-497.
- 2039 Murray CJL. (2013). Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-
2040 cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global
2041 Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 10;385(9963):117-71
- 2042 National Center for Biotechnology Information/Taxonomy:
2043 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=217322> [08-04-2022. 01:08 h]
- 2044 Nicasio-Torres MP, Meckes-Fisher M, Aguilar-Santamaría L, Garduño-Ramírez ML, Chávez-Avila VM, Cruz-Sosa
2045 F (2012). Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli
2046 and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. *Acta Physiol Plant* 1(34):307-316. doi:10.1007/s11738-
2047 011-0830-9
- 2048 Nicasio-Torres, M., Pérez-Hernández, J., González-Cortazar, M., Meckes-Fischer, M., Tortoriello, J., & Cruz-Sosa, F.
2049 (2016). Production of potential anti-inflammatory compounds in cell suspension cultures of *Sphaeralcea*
2050 *angustifolia* (Cav.) G. Don. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(8). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2211-x>
- 2051 Nicasio-Torres, M., Serrano-Román, J., Pérez-Hernández, J., Jiménez-Ferrer, E., & Herrera-Ruiz, M. (2017). Effect of
2052 Dichloromethane-Methanol Extract and Tomentin Obtained from *Sphaeralcea angustifolia* Cell Suspensions
2053 in a Model of Kaolin/Carrageenan-Induced Arthritis. *Planta Medica International Open*, 4(01), e35-e42.
2054 <https://doi.org/10.1055/s-0043-108760>
- 2055 Ochoa-Villarreal, Howat, S., Hong, S. M., Jang, M. O., Jin, Y. W., Lee, E. K., & Loake, G. J. (2016). Plant cell culture
2056 strategies for the production of natural products. *BMB Reports*, 49(3), 149-158.
2057 <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.3.264>
- 2058 Olbe, L., Carlsson, E., & Lindberg, P. (2003). A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and
2059 esomeprazole. *Nature reviews drug discovery*, 2(2), 132-139.
- 2060 Palazón J, Cusidó R M, Roig C, Pinol M T. (1997). Effect of rol genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on
2061 nicotine production in tobacco root cultures. *Plant physiology and biochemistry*, 35: 155-162.
- 2062 Palazón, J., Cusidó, R. M., Gonzalo, J., Bonfill, M., Morales, C., & Piñol, M. T. (1998b). Relation between the amount
2063 of rolC gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* transformed root
2064 cultures. *Journal of plant physiology*, 153(5-6), 712-718.
- 2065 Pan, R., Dai, Y., Yang, J., Li, Y., Yao, X., & Xia, Y. (2009). Anti-angiogenic potential of scopoletin is associated with
2066 the inhibition of ERK1/2 activation. *Drug Development Research*, 70(3), 214-219.
2067 <https://doi.org/10.1002/ddr.20297>
- 2068 Pérez-Hernández, J., González-Cortazar, M., Marquina, S., Herrera-Ruiz, M., Meckes-Fischer, M., Tortoriello, J., Cruz-
2069 Sosa, F., & Nicasio-Torres, M. D. P. (2014). Sphaeralcic acid and tomentin, anti-inflammatory compounds
2070 produced in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia*. *Planta Medica*, 80(2-3), 209-214.
2071 <https://doi.org/10.1055/s-0033-1360302>
- 2072 Pérez-Hernández, J., Nicasio-Torres, M. del P., Sarmiento-López, L. G., & Rodríguez-Monroy, M. (2019a). Production
2073 of anti-inflammatory compounds in *Sphaeralcea angustifolia* cell suspension cultivated in stirred tank
2074 bioreactor. *Engineering in Life Sciences*, 19(3), 196-205. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800134>
- 2075 Pérez-Hernández, J., Martínez-Trujillo, A., & Nicasio-Torres, P. (2019b). Optimization of active compounds production
2076 by interaction between nitrate and copper in *Sphaeralcea angustifolia* cell suspension using Response Surface
2077 Methodology.
- 2078 Peschke, V. M., & Phillips, R. L. (1992). Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in*
2079 *genetics*, 30, 41-75.
- 2080 Phuong, V. T. B., Hong, P. T. A., & Phuong, Q. N. D. (2018). Improving hairy root induction of *Urena lobata* L. by
2081 *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 by some factors. *Science and Technology Development Journal*,
2082 21(3), 90-97. <https://doi.org/10.32508/stdj.v21i3.430>
- 2083 Rajashekar, J., Kumar, V., Veerashree, V., Poornima, D. V., Sannabommaji, T., Gajula, H., & Giridhara, B. (2016).
2084 Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second
2085 Edition. 1391(April), 427-443. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7>
- 2086 Raña GR, Villanueva C, MA, Avendaño R, JM, Nogueira JR, Jiménez C. Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de
2087 la enfermedad por úlcera péptica. *Rev gastroenterol Mex*. 2009; 74 (2) 144-148.
- 2088 Rhodes M J C, Robins R J, Hamill J D, Parr A J, Walton N J. (1987). Secondary product formation using *Agrobacterium*
2089 *rhizogenes* transformed hairy root cultures. *IAPTC Newsletter*, 53: 2-15.
- 2090 Rhodes M J C. (1990). Properties of transformed root cultures. Secondary metabolites from plant tissue culture, 201:25

2091 Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular*
2092 *biology*, 31(5), 986-1000.

2093 Romero-Cerecero, O., Meckes-Fischer, M., Zamilpa, A., Enrique Jiménez-Ferrer, J., Nicasio-Torres, P., Pérez-García,
2094 D., & Tortoriello, J. (2013). Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea*
2095 *angustifolia* treatment in hand osteoarthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(2), 467–473.
2096 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.040>

2097 Rossi, L., Hohn, B., & Tinland, B. (1996). Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of
2098 virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
2099 *United States of America*, 93(1), 126–130. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.126>

2100 Ru, M., An, Y., Wang, K., Peng, L., Li, B., Bai, Z., ... & Liang, Z. (2016). *Prunella vulgaris* L. hairy roots: culture,
2101 growth, and elicitation by ethephon and salicylic acid. *Engineering in Life Sciences*, 16(5), 494-502.

2102 Rzedowski G y Rzedowski J. (2001). Flora fanerogamica del Valle de México. Instituto Nacional de Ecología. 2a ed.
2103 México; 393-395, 406-408.

2104 Sachs, G., Shin, J. M., & Howden, C. W. (2006). The clinical pharmacology of proton pump inhibitors. *Alimentary*
2105 *pharmacology & therapeutics*, 23, 2-8.

2106 Sarkar, S., Ghosh, I., Roychowdhury, D., & Jha, S. (2018). The effects of rol genes of *Agrobacterium rhizogenes* on
2107 morphogenesis and secondary metabolite accumulation in medicinal plants. In *Biotechnological approaches*
2108 *for medicinal and aromatic plants* (pp. 27-51). Springer, Singapore.

2109 Sajjalaguddam, R. R., & Paladugu, A. (2016). Quercetin Production From Hairy Root Cultures of Indian Mallow
2110 (*Abutilon indicum* L.). 5(11), 956–967. <https://doi.org/10.20959/wjpps201611-7962>

2111 Schindler U, Sans N, Schröder J. (1989). Ornithine cyclodeaminase from octopine Ti plasmid Ach5: identification, DNA
2112 sequence, enzyme properties, and comparison with gene and enzyme from nopaline Ti plasmid C58. *Journal of*
2113 *bacteriology*, 171: 847-854.

2114 Schubert, M. L., and Peura, D. A. (2008). Control of gastric acid secretion in health and
2115 disease. *Gastroenterology*, 134(7), 1842-1860.

2116 Schweizer, F., Colinas, M., Pollier, J., Van Moerkercke, A., Bossche, R. V., De Clercq, R., & Goossens, A. (2018). An
2117 engineered combinatorial module of transcription factors boosts production of monoterpenoid indole alkaloids
2118 in *Catharanthus roseus*. *Metabolic engineering*, 48, 150-162.

2119 Secretaria de Salud (2021). Panorama epidemiológico de las enfermedades no transmisibles en México. Boletín
2120 epidemiológico, junio 2021.

2121 Serrano-Román J. Bióloga Jade Leonor Serrano Román. (2015). Maestría en Medicina Molecular, Facultad de Medicina,
2122 Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Caracterización farmacológica de tomentina y ácido
2123 sphaeralcico aislados de suspensiones celulares de *Sphaeralcea angustifolia* en un modelo de artritis
2124 experimental. Cuernavaca Morelos, 100 pp.

2125 Serrano-Román, J., Nicasio-Torres, P., Hernández-Pérez, E., & Jiménez-Ferrer, E. (2020). Elimination pharmacokinetics
2126 of sphaeralcic acid, tomentin and scopoletin mixture from a standardized fraction of *Sphaeralcea angustifolia*
2127 (Cav.) G. Don orally administered. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 183.
2128 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113143>

2129 Sevón N, Oksman-Caldentey K M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source
2130 of alkaloids. *Planta Medica*; 68: 859-868.

2131 Shaw, C. Y., Chen, C. H., Hsu, C. C., Chen, C. C., & Tsai, Y. C. (2003). Antioxidant properties of scopoletin isolated
2132 from *Sinomonium acutum*. *Phytotherapy Research*, 17(7), 823–825. <https://doi.org/10.1002/ptr.1170>

2133 Shen W H, Petit A, Guern J, Tempé J. (1988). Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proceedings of*
2134 *the National Academy of Sciences*, 85: 3417-3421.

2135 Shi, M., Liao, P., Nile, S. H., Georgiev, M. I., & Kai, G. (2021). Biotechnological exploration of transformed root culture
2136 for value-added products. *Trends in Biotechnology*, 39(2), 137-149.
2137 <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.06.012>

2138 Shkryl Y N, Veremeichik G N, Bulgakov V P, Tchernoded G K, Mischenko N P, Fedoreyev S A, Zhuravlev Y N. (2008).
2139 Individual and combined effects of the rolA, B, and C genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia*
2140 transformed calli. *Biotechnology and bioengineering*, 100: 118-125.

2141 Siatka, T., & Kasparova, M. (2008). Effects of auxins on growth and scopoletin accumulation in cell suspension cultures
2142 of *Angelica archangelica* L. *Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske*
2143 *farmaceuticke spolecnosti*, 57(1), 17-20.

2144 Sidwa-Gorycka, M., Krolicka, A., Orlita, A., Malinski, E., Golebiowski, M., Kumirska, J., ... & Lojkowska, E. (2009).
2145 Genetic transformation of *Ruta graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*: hairy root cultures a promising

2146 approach for production of coumarins and furanocoumarins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*
2147 (*PCTOC*), 97(1), 59-69.

2148 Skirvin, R. M., McPheeters, K. D., & Norton, M. (1994). Sources and frequency of somaclonal
2149 variation. *HortScience*, 29(11), 1232-1237.

2150 Sun, J., Ma, L., San, K. Y., & Peebles, C. A. (2017). Still stable after 11 years: a *Catharanthus roseus* hairy root line
2151 maintains inducible expression of anthranilate synthase. *Biotechnology progress*, 33(1), 66-69.

2152 Staniszewska, I., Królicka, A., Maliński, E., Łojkowska, E., & Szafranek, J. (2003). Elicitation of secondary metabolites
2153 in in vitro cultures of *Ammi majus* L. *Enzyme and microbial technology*, 33(5), 565-568.

2154 Stiles, A. R., & Liu, C. Z. (2013). Hairy root culture: bioreactor design and process intensification. *Biotechnology of*
2155 *hairy root systems*, 91-114.

2156 Strand, D. S., Kim, D., & Peura, D. A. (2017). 25 years of proton pump inhibitors: a comprehensive review. *Gut and*
2157 *liver*, 11(1), 27.

2158 Trovato, M., Mattioli, R., & Costantino, P. (2018). From A. rhizogenes RolD to plant P5CS: exploiting proline to control
2159 plant development. *Plants*, 7(4), 108.

2160 Tavassoli, P., & Safipour Afshar, A. (2018). Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root
2161 induction and analysis of phenolic and flavonoid compounds in marshmallow (*Althaea officinalis* L.). *3*
2162 *Biotech*, 8(8), 0. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1375-z>

2163 Thani, W., Vallisuta, O., Siripong, P., & Ruangwises, N. (2010). Anti-proliferative and antioxidative activities of Thai
2164 noni/Yor (*Morinda citrifolia* Linn.) leaf extract. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public*
2165 *Health*, 41(2), 482-489.

2166 Tinland B. (1996). The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in plant science*, 1: 178-184.

2167 Triplett, B. A., Moss, S. C., Bland, J. M., & Dowd, M. K. (2008). Induction of hairy root cultures from *Gossypium*
2168 *hirsutum* and *Gossypium barbadense* to produce gossypol and related compounds. *In Vitro Cellular and*
2169 *Developmental Biology - Plant*, 44(6), 508-517. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9141-2>

2170 Trovato M, Mauro M L, Costantino P, Altamura M M. (2001). The plant oncogene rolD encodes a functional ornithine
2171 cyclodeaminase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 13449-13453.

2172 Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR. (2005). Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse
2173 effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *J Exp Bot* 56:309-
2174 321

2175 Vilaine F, Casse-Delbart F. (1987). Independent induction of transformed roots by the TL and TR regions of the Ri
2176 plasmid of agropine type *Agrobacterium rhizogenes*. *Molecular and General Genetics*, 206: 17-23.

2177 Villaseñor R. J. L.; Espinosa-García, y FJ. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de
2178 México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, DF. 45-47

2179 Watanabe T, Higuchi K, Tominaga K. (2001). Acid regulates inflammatory response in a rat model of induction of
2180 gastric ulcer recurrence by interleukin 1beta. *Gut*. 48: 774-781.

2181 Wang, Y., Yang, B., Zhang, M., Jia, S., & Yu, F. (2019). Application of transport engineering to promote catharanthine
2182 production in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139(3), 523-
2183 530.

2184 White F F, Taylor B. H, Huffman G A, Gordon M P, Nester E W. (1985). Molecular and genetic analysis of the
2185 transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of bacteriology*;
2186 164: 33-44.

2187 Wigati, D.; Anwar, K.; Sudarsono; Nugroho, A.E. (2017). Hypotensive activity of ethanolic extracts of *Morinda citrifolia*
2188 L. leaves and fruit in dexamethasone-induced hypertensive rat. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*,
2189 22, 107-113, <https://doi.org/10.1177/2156587216653660>.

2190 Xu, Q. L., Hu, Z., Li, C. Y., Wang, X. Y., & Wang, C. Y. (2009). Tissue culture of *Sinningia speciosa* and analysis of
2191 the in vitro-generated tricussate whorled phyllotaxis (twp) variant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-*
2192 *Plant*, 45(5), 583-590.

2193 Yancheva, S., Georgieva, L., Badjakov, I., Dincheva, I., Georgieva, M., Georgiev, V., & Kondakova, V. (2019).
2194 Application of bioreactor technology in plant propagation and secondary metabolite production. *Journal of*
2195 *Central European Agriculture*, 20(1), 321-340.

2196 Yousefian, Z., Golkar, P., & Mirjalili, M. H. (2021). Production enhancement of medicinally active coumarin and
2197 phenolic compounds in hairy root cultures of *Pelargonium sidoides*: the effect of elicitation and sucrose. *Journal*
2198 *of Plant Growth Regulation*, 40(2), 628-641.

2199 Zambryski P. (1988). Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annual review*
2200 *of genetics*, 22: 1-30.

2201 Zeng, Y., Ma, Y., Yang, Z., Mao, J., & Zheng, Y. (2020). Antihyperuricemic efficacy of Scopoletin-loaded Soluplus
2202 micelles in yeast extract/potassium oxonate-induced hyperuricemic mice. *Drug Development and Industrial*
2203 *Pharmacy*, 46(9), 1550–1557. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1811302>



Anti-inflammatory compounds produced in hairy roots culture of *Sphaeralcea angustifolia*

Rogelio Reyes-Pérez^{1,2} · Maribel Herrera-Ruiz² · Irene Perea-Arango¹ · Fernando Martínez-Morales¹ · José De Jesús Arellano García¹ · Pilar Nicasio-Torres²

Received: 27 April 2021 / Accepted: 27 August 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

Sphaeralcea angustifolia (Cav) G. Don is used in traditional Mexican medicine to treat inflammations and gastric disease. Its anti-inflammatory and immunomodulatory activities in mice and rats acute and chronic models have been attributed mainly to scopoletin. Scopoletin reduced joint inflammation, the number of new vessels, production of endogenous angiogenic inducers, and reversed the histopathological alterations in rat adjuvant-induced arthritis. Tomentin and sphaeralcic acid from *S. angustifolia* cells in suspension proved anti-inflammatory and immunomodulatory activities in mice kaolin/ λ -carrageenan-induced arthritis. Transformed roots of *S. angustifolia* have been proposed as active compounds producers. A high transformation frequency mediated by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834/pTDT was obtained from nodal segments ($59.5 \pm 10.5\%$, 145 hairy root lines) and leaves (40.0 ± 25 , 52 hairy root lines) of 2-month-old plantlets. Among seven lines selected according to their phenotypic characteristics and growth index, the SaTR N7.2 line presented the highest sphaeralcic acid production (17.6 ± 1.72 mg/g DW); this production was 440-fold superior to that reported in *S. angustifolia* wild plants, and in comparison to cells in suspension of *S. angustifolia* in MS medium with nitrate restriction this was 263-fold higher when cultured in flasks and 5-fold higher in a stirred-tank type bioreactor. The SaTR N7.2, SaTR N5.1, SaTR N7.1, and SaTR N15.1 lines excreted sphaeralcic acid into the culture medium at similar levels. Genetic transformation of hairy roots was confirmed by amplifying a 490 bp fragment of the *rolC* gene. After 2 years in culture, *S. angustifolia* hairy roots are producers of scopoletin and sphaeralcic acid and they can be stressed by nitrate reduction and/or copper increased to stimulate scopoletin and sphaeralcic acid production.

Key message

Hairy roots lines of *Sphaeralcea angustifolia* producers of scopoletin and sphaeralcic acid anti-inflammatory compounds were established by first time through plant transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834/pTDT.

Keywords *Agrobacterium rhizogenes* · Malvaceae · Scopoletin · Tomentin · Sphaeralcic acid

Communicated by Ali R. Alan.

✉ José De Jesús Arellano García
jesus.arellano@uaem.mx

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

¹ Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB), Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Avenida Universidad #1001, Chamilpa, Cuernavaca 62209, Morelos, México

² Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina #1 Centro, Xochitepec 62790, Morelos, México

Abbreviations

DW	Dry weight
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FW	Fresh weight
FCA	Freund's complete adjuvant
GI	Growth index
IL	Interleukin
MS	Murashige and skoog medium
OD	Optical density
Ri	Root inducing
PGR	Plant growth regulators
pTDT	Plasmid threonine deaminase gene of tomato
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
WP	Woody plant medium.

Published online: 08 September 2021

Springer



Universidad Autónoma del Estado de Morelos



DES de Ciencias Naturales

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Rogelio Reyes Pérez

Por la presentación de su CARTEL:

Inducción de raíces pilosas en explantes aéreos de *Sphaeralcea angustifolia* mediante *Agrobacterium rhizogenes*.

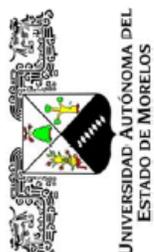
en el *V Congreso de Estudiantes del Doctorado en Ciencias Naturales*

Auditorio del Centro de Investigación en Biotecnología

23 de Noviembre del 2018

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Director del Centro de Investigación
en Biotecnología

Dra. Ma. Luisa Villarreal Ortega
Coordinadora del Programa del Doctorado
en Ciencias Naturales



VI Congreso de Estudiantes del Doctorado en Ciencias Naturales

Universidad Autónoma del Estado de Morelos
DES de Ciencias Naturales

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Rogelio Reyes Pérez

Por la presentación de su cartel “ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE RAICES TRANSFORMADAS POR *Agrobacterium rhizogenes* DE *Esphaeralcea angustifolia* PARA LA PRODUCCION DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTI-ULCEROGÉNICA ” en el **VI Congreso de Estudiantes del Doctorado en Ciencias Naturales** Auditorio del Centro de Investigación en Biotecnología 27 de Septiembre del 2019

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
Director del Centro de Investigación en Biotecnología

Dra. Ma. Luisa Villarreal Ortega
Coordinadora del Programa del Doctorado en Ciencias Naturales



Los recursos del PFCE son de carácter público y queda prohibido su uso con fines partidistas o de promocional personal



VI Congreso de Estudiantes del Doctorado en Ciencias Naturales
 Universidad Autónoma del Estado de Morelos
 DES de Ciencias Naturales

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Rogelio Reyes Pérez

Por haber obtenido el PRIMER LUGAR en la modalidad de CARTEL
 en el **VI Congreso de Estudiantes del Doctorado en Ciencias Naturales**
 Auditorio del Centro de Investigación en Biotecnología
 27 de Septiembre del 2019

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez
 Director del Centro de Investigación en Biotecnología

Dra. Ma. Luisa Villarreal Ortega
 Coordinadora del Programa del Doctorado en Ciencias Naturales



Los recursos del PFCE son de carácter público y queda prohibido su uso con fines partidistas o de promocional personal

**La Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales, A. C. y
la Universidad Autónoma de San Luis Potosí**

Otorgan la presente
Constancia

Rogelio Reyes Pérez, José de Jesús Arellano García, María del Pilar Nicasio Torres

a:

Por su valiosa participación en la modalidad de cartel con el tema:
**Inducción de raíces pilosas en explantes aéreos de *Sphaeralcea angustifolia*
mediante *Agrobacterium rhizogenes***

Durante la 15ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, 22 al
25 de mayo de 2019 en San Luis Potosí, SLP., México




Dra. Bertha Irene Juárez Flores
Presidenta del Comité Organizador


Dra. Denisse Atenea de Loera Carrera
Vicepresidenta del Comité Organizador


Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez
Presidente de la AMIPRONAT

DEL 17 AL 19 DE JULIO, DE 2019
MÉRIDA, YUCATÁN

EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Otorga la presente

CONSTANCIA

Al trabajo de investigación

OBTENCIÓN DE RAÍCES PILOSAS DE SPHAERALCEA ANGSTIFOLIA MEDIADA POR
AGROBACTERIUM RHIZOGENES PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS
ANTI-INFLAMATORIOS.

Autor(es): Reyes-Pérez Rogelio, Arellano-García José de Jesús, Herrera-Ruiz Maribel Lucila,
Nicacio-Torres María Del Pilar.

Dr. **Pedro Armándo Marín Campos**
Titular de la Delegación Estatal en Yucatán
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. **César Raúl González Bonilla**
Titular de la Coordinación de Investigación en Salud
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dr. **Luis Alberto Méndez Trujique**
Director de la Escuela de Ciencias de la Salud
Universidad Marista de Mérida



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

OTORGA LA PRESENTE

Constancia

Al trabajo de investigación

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS POR AGROBACTERIUM RHIZOGENES DE SPHAERALCEA ANGSTIFOLIA PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTI-ULCEROGÉNICA

Autor(es): Reyes-Pérez Rogelio, Arellano-García José de Jesús, Herrera-Ruiz Maribel Lucila, Nicasio-Torres María del Pilar.

XXVIII Foro Nacional de Investigación en Salud

Del 2 al 4 de Octubre del 2019 en la Ciudad y Puerto de Acapulco Guerrero.


Dr. Francisco Hernández Torres.
Delegado Estatal. Delegación Guerrero.
Instituto Mexicano del Seguro Social.


Dr. César Raúl González Bonilla.
Coordinador de Investigación en Salud.
Instituto Mexicano del Seguro Social.


Dr. Bulfrano Pérez Elizalde.
Director de la Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Guerrero.



**1er Foro Webinar CIBIS- IMSS
Del 6 al 9 de Octubre del 2020**



CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL SUR

DEL

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A

**Rogelio Reyes Pérez, José de Jesús Arellano García, Maribel Lucila Herrera Ruiz,
Fernando Martínez Morales, Irene Perea Arango, María del Pilar Nicasio Torres**

Por la ponencia titulada

Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivo de raíces transformadas de *Sphaeralcea angustifolia*

**Dr. Alejandro Zamulpa Alvarez
Presidente del Comité Organizador**

**Dra. María del Pilar Nicasio Torres
Coordinadora Académica del CIBIS**

LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES OTORGAN LA PRESENTE:

CONSTANCIA

a: Rogelio Reyes Pérez, José de Jesús Arellano García, Maribel Lucila Herrera Ruiz, Fernando Martínez Morales, Irene Perea Arango, María del Pilar Nicasio Torres.

Por haber presentado el trabajo titulado:

Efecto de la concentración de ANA sobre la producción de escopoletina y ácido sphaerólíco en cultivos de células en suspensión de Sphaeralcea angustifolia

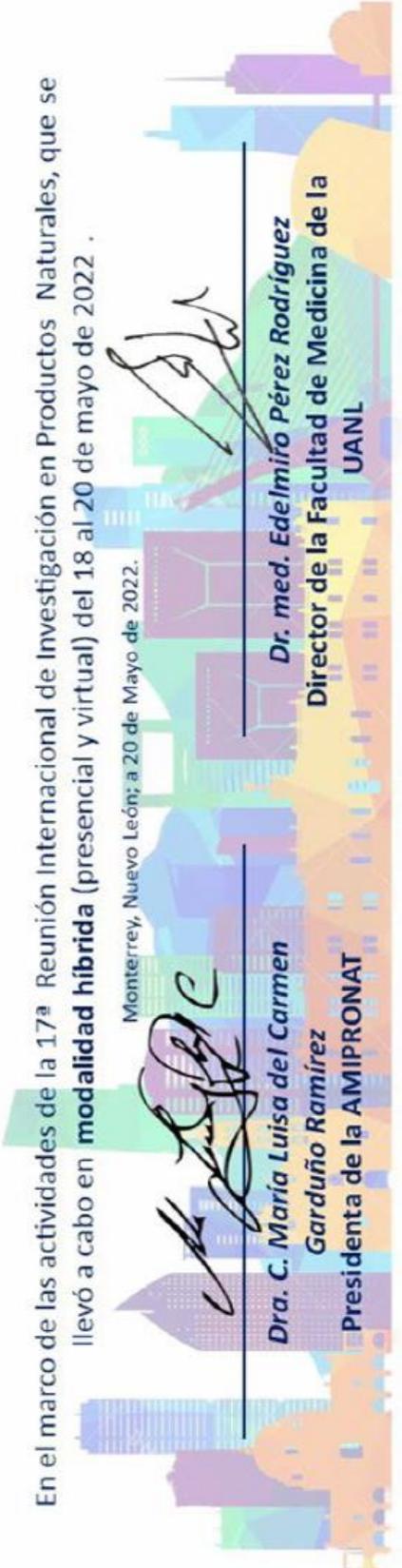
En el marco de las actividades de la 17ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, que se llevó a cabo en **modalidad híbrida** (presencial y virtual) del 18 al 20 de mayo de 2022 .



Dra. C. María Luisa del Carmen
 Garduño Ramírez
 Presidenta de la AMIPRONAT



Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez
 Director de la Facultad de Medicina de la UANL





La Universidad Autónoma del Estado de Morelos
a través de las Unidades Académicas de la

DES de Ciencias Naturales

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Rogelio Reyes Pérez

Por su participación con la ponencia:

"Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivos de raíces transformadas de *Sphaeralcea angustifolia*"

En el VII Congreso de Estudiantes del Doctorado en Ciencias Naturales

Cuernavaca, Morelos, 6 y 7 de mayo de 2021

Comité Organizador

Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Directora del Centro de Investigación en Biotecnología

Dra. Michelle Monterosas Brisson
Directora de la Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Coordinador del Doctorado en Ciencias Naturales

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Coordinadora de Línea Terminal de Biotecnología

Dra. Marcela Osorio Beristain
Coordinadora de Línea Terminal de Biología Evolutiva y Conservación



La Universidad Autónoma de Zacatecas “Francisco García Salinas”
y la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales, A.C.

Otorgan la presente

Constancia

A: Rogelio Reyes Pérez*, José de Jesús Arellano García, Maribel Lucila Herrera Ruíz, Irene Perea Arango, María del Pilar Nicacio Torres.

Por su valiosa participación en la **PRESENTACIÓN DE CARTEL** en la **16ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales** Zacatecas 2021 | Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez con el **TRABAJO LIBRE: QB109 | Química y biotecnología (QB)**.

“Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivos de raíces transformadas de Sphaeralcea angustifolia”

que se llevó a cabo mediante la **modalidad en línea (aula virtual)** el día **19 al 21 de mayo de 2021**.

Zacatecas, Zac., a 19 de junio de 2021



M. en C. Hans Hiram Pacheco García
Secretario Académico
Universidad Autónoma de Zacatecas
“Francisco García Salinas”



Dra. en C. María Luisa del Carmen Garduño Ramirez
Presidenta de la AMIPRONAT, A.C.



Dra. en C. Virginia Flores Morales
Presidenta del Comité Organizador Local
16ªRIIPN 2021 Zacatecas

REGISTRO INSTITUCIONAL	
LIBRO:	5
HOJA:	117
FOLIO:	4165
FECHA:	19/06/2021
VALOR CURRICULAR	14 (catorce) Horas curriculares
CONVENIO:	D-526-H166-L30 0868-4165

SELLO DIGITAL

D-526-H166-L30|0868|4165|19|17|14|Rogelio Reyes Pérez|ronreyesR@gmail.com|Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivos de raíces transformadas de Sphaeralcea angustifolia|0868|https://doi.org/10.24304/zacatecas2021.com.mx/downloads/WWW_GENCon_16RIIPN/COMPROBANTES/0868.pdf

Convenio General UAZ | 16RIIPN D-526-H166-L30-2021
168vo. Constancia con Firma electrónica simplificada
Firmado digitalmente por 26RIIPN-2021-UAL-AMIPRONAT
Fecha: 19/06/2021 18:23:23 | Localización: Zacatecas, Zac. MX
hash Certificado:
2510147630299C171CD6483D77409A81912F7088D710F79F4C114829142D3A | Versión: 2.2.1.52



FACULTAD
DE MEDICINA

Reunión Internacional de Investigación
en Productos Naturales
Dr. Xiomara M. Hernández-Morales



18-20 de mayo del 2022 | Monterrey, N.L., México

Amipronat
Asociación Mexicana de Investigación
en Productos Naturales

LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES OTORGAN LA PRESENTE:

CONSTANCIA

Rogelio Reyes Pérez, José de Jesús Arellano García, Maribel Lucila Herrera Ruiz, Fernando Martínez Morales, Irene Perea Arango, María del Pilar Nicasio Torres.

a:

Por haber presentado el trabajo titulado:

Efecto de la concentración de ANA sobre la producción de escopoletina y ácido sphaerálcico en cultivos de células en suspensión de Sphaeralcea angustifolia

En el marco de las actividades de la 17ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, que se llevó a cabo en **modalidad híbrida** (presencial y virtual) del 18 al 20 de mayo de 2022 .

Monterrey, Nuevo León; a 20 de Mayo de 2022.


**Dra. C. María Luisa del Carmen
Garduño Ramírez**
Presidenta de la AMIPRONAT


Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez
Director de la Facultad de Medicina de la
UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales

Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (director de tesis, CEIB UAEM)
Dra. María del Pilar Nicasio Torres (codirector de tesis, CIBIS IMSS)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz (CIBIS IMSS)
Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS IMSS)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (CEIB UAEM)

Tesis: "Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivos transformados de *Sphaeralcea angustifolia*"

Alumno que lo presenta a revisión: ROGELIO REYES PÉREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ DE JESÚS ARELLANO GARCÍA



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA | Fecha:2022-06-15 19:34:40 | Firmante
fei8da3aX8A1Y9/yE45w7yhTQ4j7TQTuVIZ785BITDb+8TPM30Bw2HeQWr+SVH+N2UKVA5oieOhIYywCGNoQ1ddTStBZZzB2QDQbzPUB8ymB3hwxQihYZL+IO1eZ/enMLdE/FT
PGwh/9xbFtrV10uVY3lAqBb4Bo24PjomCDkKSpEuzQyXD3KD9AiYuC3hUu8zLz3ufxhhJDrZEgtv89nrukwpP+aToky2FvqR22BEJ4/YbidCh5GRF0D5ogkK+aOgkvk+mInyePJO
c2W5snGzctdieKwuvohDjjLoPanBez/SiTpyhWIK8zFWJGFFg57yWoCjK91O4yoGUM4fA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



8ZaTWbvAs

<https://efirma.uaem.mx/InoRepudio/3phVcuapGSOTAZPKAuUS9B4Z5JvOsOaf>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (director de tesis, CEIB UAEM)
Dra. María del Pilar Nicasio Torres (codirector de tesis, CIBIS IMSS)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz (CIBIS IMSS)
Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS IMSS)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (CEIB UAEM)

Tesis: "Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivos transformados de *Sphaeralcea angustifolia*"

Alumno que lo presenta a revisión: ROGELIO REYES PÉREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA DEL PILAR NICASIO TORRES



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARÍA DEL PILAR NICASIO TORRES | Fecha:2022-06-23 14:17:13 | Firmante
Tu0M1EsMLCx+u8Nh2XrZjknMHoMXdBXX4ccwFJEyG/Sz3EIZ0ier3+vofCxXNjH0aLuQKEklu0yPnzZ+JN5PWGYPRyDIXomJtcYNTxCgGD4QbGY0WCAPCXDf+jr21FFKyTI0IZ
3mEWtdmzWZ0KT9q6QPm23e8AW4sZviCK/vEBLzTopEg9mp/UE+BwzIReAAyNAUzM1/pUj/EHgOkNZldXC2ED3+Ra53UY9X3B8Evp6RidDmDgr/r/U8OB+JSwOVXWfY6dxh
H+HiSnkK75zyetoGMs1wX/OAILUPSpU1voFdaKqx/cEZI+JUCrJuPPcBaOXmJ4Vaq72Ucpo0sdmktw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



zkDXBGrdM

<https://efirma.uaem.mx/hoRepudio/ccSBimxWgNYIB0bkiNONUkad53DaXDKS>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

2225

2226

Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (director de tesis, CEIB UAEM)
Dra. María del Pilar Nicasio Torres (codirector de tesis, CIBIS IMSS)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz (CIBIS IMSS)
Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS IMSS)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (CEIB UAEM)

Tesis: "Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivos transformados de *Sphaeralcea angustifolia*"

Alumno que lo presenta a revisión: ROGELIO REYES PÉREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2022-06-15 21:09:43 | Firmante
dUBMUGnW+58W9CZ/+pgh88py0217jrZMRYBIYn0UtytDik/6D0PGVmyxRtVND0ils8v+aXlyCTDYFW6Lmt5pN7K1/eE/U8EK44TYadt+GvhBxtj1ch2bCi+X4ZJdi/k/cCpoe5kAjW
VV9kyvdEQ9f5tuo8gKSMtIFdMAXP8UDSPxsjCKqWebEYmon5dBkzivJjPVLkwNKH/78wKb+IPA/lew4fG//N/Oo/2g/qfVmZ+GJyfkKtLJyE8hFDoyN4Mzz1c9VaB2vkZcgc0phLV
WozL7z40J2tRle3MajLQzW2XVMQWktyQ1nSm3mmcwDNV65gXyG8bsLnzU9OjTAA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



OgyF5VijK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/0EmgKeM3aFKsSHbso306ki4P8qWupUhC>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

2230

2231

2232

Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (director de tesis, CEIB UAEM)
Dra. María del Pilar Nicasio Torres (codirector de tesis, CIBIS IMSS)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz (CIBIS IMSS)
Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS IMSS)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (CEIB UAEM)

Tesis: "Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivos transformados de *Sphaeralcea angustifolia*"

Alumno que lo presenta a revisión: ROGELIO REYES PÉREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2022-06-21 12:06:27 | Firmante A6l2MwItCboay+SsDZ39VYE9ZDAqY9QO+YMQfWGxWrZs9tugmUu9tQ5XZSp/q4Euerqj9zT7fjZtoZIW0HH/E1ykkn3tMLNb9bV/a4y7pd9+nRa+q3hZV+hRFg/vgd4fiopMrbBhij 54bvEJHN4Nz70C7+eZZwDPxdYZe2reFojWg/0kclz+zJ/hsuOR3P8jqT1aCBGRtVO/F6aKt4u9lJjwrJxJ8ZmEqllSUseK/86N3yqihy2xZPHAu0w6xP68qgME+3W6Q1exTuwwCtm yMd9uiPKXv8201BsbqWfJYU2qKFMnH4Vn0w9j9LI470mVQanDoOfbbMdgR4MFg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



nJs5QEG04

<https://efirma.uaem.mx/NoRepudio/4HLmQTJdsBj8oQuipVpMM3BTymbzyVYS>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

2236
2237
2238

Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (director de tesis, CEIB UAEM)
Dra. María del Pilar Nicasio Torres (codirector de tesis, CIBIS IMSS)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz (CIBIS IMSS)
Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS IMSS)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (CEIB UAEM)

Tesis: "Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivos transformados de *Sphaeralcea angustifolia*"

Alumno que lo presenta a revisión: ROGELIO REYES PÉREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUÍZ



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ | Fecha:2022-06-16 08:13:22 | Firmante
MKu3Zs56x8H01gxTwwJdRPFf3oT7qYbnJLhf5SeQOlowJADb9rFa9VXowSf5F5pc8hA78+Yp5UqM9pZHVJXkt8PWup454pYYiUdgg2U9ounOo7o3xmxh9KoB8mkSvHBYy6Jz
SxJITPJC8M2WlrTAEY3xIBhsC7iUimRxTnSC6G2Spa0l6+0ASFOPhRMbzwhRtll98CwGGeCateBe5JLKL0a/GDJ8BY4eCuiv7MG4ZEzWyALQvGt0R1BxaFUIh3rRB/D0hIZegv
HDnS5vaVlxQu3Dh81lNm50e408s97S+rx8mV3Yznu01m/d8iea8awlKGGIPa2zBIXUG7JUyA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



tAg1FzmSn

<https://efirma.uaem.mx/noRepudiojXy9q9bfPUkgZzB7IAokNzMLTk9OmCc>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

2241

2242

Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (director de tesis, CEIB UAEM)
Dra. María del Pilar Nicasio Torres (codirector de tesis, CIBIS IMSS)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz (CIBIS IMSS)
Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS IMSS)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (CEIB UAEM)

Tesis: "Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivos transformados de *Sphaeralcea angustifolia*"

Alumno que lo presenta a revisión: ROGELIO REYES PÉREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

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

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR | Fecha:2022-06-16 08:14:54 | Firmante
LHvaxeK2iO3Zw8nmeHoQAfRsGau/cFRAiMWDgV8K5r3yUf16lnD1/h2U2F4eB2rM3OkQabWDx2r5snhJPCePD5G06jesXYFr2FF8WnraZ/Un5hs8MqCVttV5l85+q21ispio4BLW
WlaFouGt8BIWkjJTsJ1Bv2C1IZFUKfOhdFQTolJaoitpdG54jUp2dBmITbcYD8HVA1rNCHUqlln9w4ofXcDr+7W74qcV/3Hwm1ni1vaN4Fzk7n38bqx56lxtfthn8wY2a3SqEsl58tqo4xt
YK0oF7kLBWIZZ+wcwI6NH5i4Kx+nYq0PQW465AAGNOdFsKu+M9Lw5WdpuJ5hs1w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[vuw5VdszH](#)

<https://efirma.uaem.mx/inoRepudio/yMk3VNNEI9E1KJaRYduRgHkRCEthqm9u>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José de Jesús Arellano García (director de tesis, CEIB UAEM)
Dra. María del Pilar Nicasio Torres (codirector de tesis, CIBIS IMSS)
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz (CIBIS IMSS)
Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS IMSS)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa (CEIB UAEM)

Tesis: "Producción de compuestos antiinflamatorios en cultivos transformados de *Sphaerolcea angustifolia*"

Alumno que lo presenta a revisión: ROGELIO REYES PÉREZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANABEL ORTIZ CALTEMPA | Fecha:2022-06-16 10:00:35 | Firmante
kospvjvux656fHLIMSAZf7Beaq8O4jjCQ8lZo25skTA1dOvlRUeEBhDcx7F2jF93WVJFQOkVqnsU5aJvMeJIRjZg8l8lrzwweh/uNcyRfuh8KRXRDb0a3C8oqdT4B/uYrB1BuDwTYr
CrFvxPawYdwitM65mHdOKZKMzQic3BJComNyXV9l5eFZiMioNtGSy7TAp1JaTco7p9GSG/WyF4wPBb5145ZRSl6Mw3HQPS9ZrZeW0s6+frKXv4my4wCSILfHdIBHI+MtluL4A
OVxIDKZLE32mnv2mX1FFyIIC+tsjTbG/6lvOfTajz0vLrJr9DhaULTBOGBqnaJcUvDOA==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[YXVjkDHmv](#)

<https://efirma.uaem.mx/InoRepudio/xWHTXdRTJt3Q3anU8pzVMgTRbWZvmTJH>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023