



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIINFLAMATORIA DE METABOLITOS
PRODUCIDOS POR CULTIVOS *in vitro* DE
Mammillaria candida Y *Turbinicarpus laui*”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

CASTILLEJOS PÉREZ ADRIANA BELÉN

DIRECTORA

DRA. MARÍA DEL SOCORRO SANTOS DÍAZ

CO-DIRECTORA

DRA. ERIKA GARCÍA CHÁVEZ



SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., ENERO 2023

El programa de Maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 000519, en el Nivel consolidado.

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT 1078267.

El presente trabajo fue sometido a análisis de similitud en la plataforma “turnitin” (<https://www.turnitin.com/es>). El informe de originalidad reportó 17% de similitud.

Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de metabolitos producidos por cultivos in vitro de *Mammillaria candida* y *Turbinicarpus laui*

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

ÍNDICE DE SIMILITUD



Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de metabolitos producidos por cultivos in vitro de *Mammillaria candida* y *Turbinicarpus laui* por Castillejos Pérez Adriana Belén está bajo una [Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
ANTIINFLAMATORIA DE METABOLITOS PRODUCIDOS POR
CULTIVOS *in vitro* DE *Mammillaria candida* Y *Turbinicarpus lau*”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

CASTILLEJOS PÉREZ ADRIANA BELÉN

Sinodales

Dra. María del Socorro Santos Díaz _____

Dra. Erika García Chávez _____

Dr. Alejandro Hernández Morales _____



San Luis Potosí, 9 de enero de 2023

Comité Académico del Posgrado en Ciencias Químicas
Presente

Por este conducto comunicamos que la tesis realizada por la alumna de maestría QFB Adriana Belén Castillejos Pérez, titulada "Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de metabolitos producidos por cultivos *in vitro* de *Mammillaria candida* y *Turbinicarpus laui*", ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación.

El examen de grado será el 13 de enero de 2023 a las 9:00 hrs. en el auditorio chico de la Facultad de Ciencias Químicas.

Atentamente

Dra. María del Socorro Santos Díaz
Directora de tesis

Dra. Erika García Chávez
Co-directora de tesis

www.uaslp.mx

Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria - CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24 40 al 46
fax (444) 826 2372

Dr. Alejandro Hernández Morales
Miembro del comité tutelar extendido

**Integrantes del subcomité de tesis, tipo de participación y
adscripción**

Dra. María del Socorro Santos Díaz

Directora de tesis

Profesora Investigadora de la Facultad de Ciencias Químicas-

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Dra. Erika García Chávez

Co-directora de tesis

Profesora Investigadora del Instituto de Investigación de Zonas

Desérticas- Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Dr. Alejandro Hernández Morales

Miembro Extendido del Comité tutorial

Profesor Investigador de la Facultad de Estudios Profesionales Zona

Huasteca- Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Agradecimientos

Al Conacyt, por la beca de maestría otorgada.

A mi directora de tesis, Dra. María del Socorro Santos Díaz por confiar en mí, por su apoyo, consejos y observaciones en todo este proceso.

A mi Co-directora, Dra. Erika García Chávez, por sus enseñanzas en la parte biológica del proyecto, por confiar en mí y por sus consejos de vida.

A mi asesor, Dr. Alejandro Hernández Morales, por sus observaciones a este proyecto.

La Ciencias es multidisciplinaria y gracias a grandes profesionistas este proyecto pudo avanzar y culminar. Mi total gratitud para:

MCA María de Lourdes Santos Díaz, por todas sus enseñanzas en el cultivo de tejidos vegetales.

Dra. Bertha Irene Juárez López, por brindarme espacio en el laboratorio de Fitoquímica y el bioterio del IIZD-UASLP.

QFB María Eugenia Reyna Ortega, por todo el apoyo técnico y por hacer más amena mi estancia en el IIZD-UASLP. Maru, sin tu apoyo hubiera estado perdida en el instituto.

Dr. Ricardo Espinosa Tanguma, por permitirme ingresar a su laboratorio para liofilizar mis muestras.

MC Alejandra Medina Hernández por su apoyo técnico con el liofilizador.

MCA Juan Francisco López Rodríguez, por su apoyo técnico en la parte de los modelos animales.

Dra. Claudia Castillo Martín Del Campo por confiar en mí para realizar el último cultivo de células en su laboratorio.

Al Personal en general del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la UASLP, por su hospitalidad y apoyo en todo momento.

Me encuentro muy agradecida con Dios y la vida por guiarme hasta este momento, por coincidir con increíbles personas. Gracias:

Irving, por ser mi guía hasta San Luis.

Rosy, Lety y Uriel por estar desde el principio, por apoyarme y creer en mí.

Escarlet y Vicentico (mis vecinirris), por ser mi primera familia en SLP.

Citlali y Pato (Mi biché), mis dos primeras amigas en SLP. Gracias por brindarme su amistad, su cariño y apoyo moral en más de una ocasión. Pato, gracias por ser mi fortaleza en muchas ocasiones.

Sari y Jaz, mis hermanitas académicas, mis días en el laboratorio y mi estancia en SLP fue más bonita con ustedes. Fuimos una gran mancuerna.

Mis primeros amigos del laboratorio de CTV: Cassandra, Cary, Marco, Issac. Chicos, gracias por compartir su vida conmigo.

Los chiquillos de servicio: Ximena, Fabián, Marifer, Jorge, por su compañía y risas en el labo.

Alberto, por ser gran inspiración y motivación en esta última etapa.

Un especial agradecimiento a mi psicóloga, Cristy Arellano, por el apoyo brindado en este proceso.

Dedicatoria

A mi principal motor en esta vida:

Mi madre, Adriana Pérez Manuel, por todo su apoyo y amor incondicional. Mami, siempre has sido mi motivación para superarme. Todo lo que soy es por ti.

Mamá Luz, mis hermanos Hecady y Marijose, mi sobrinito Ezra Natsu y toda mi familia, pensar que los tengo junto a mí, a la distancia, me hace sonreír todos los días. Los amo.

Mi padre, Héctor Castillejos Santiago, donde estés tu luz me guía.

Resumen

El objetivo del proyecto fue evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria, *in vitro* e *in vivo*, de extractos de callos y suspensiones de *Mammillaria candida* (*Mc*) y *Turbincarpus laui* (*TI*). Los callos se irradiaron con luz UV y las suspensiones se expusieron a quitosano para incrementar el contenido de metabolitos. La actividad antioxidante se determinó mediante ensayos FRAP y TBARS, y la antiinflamatoria cuantificando el TNF α usando dos modelos de inflamación aguda. Los resultados mostraron que los metabolitos de *Mc* y *TI* tienen actividad antioxidante similar o superior a la vitamina E y actividad antiinflamatoria (*in vitro* e *in vivo*) mayor a la indometacina. Se concluye que los cultivos de *Mc* y *TI* son fuente de metabolitos antioxidantes y antiinflamatorios.

Palabras clave: Actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, cultivos *in vitro*, *Mammillaria candida*, *Turbincarpus laui*

Abstract

The aim of this project was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antioxidant and anti-inflammatory activity of callus and suspensions from *Mammillaria candida* (*Mc*) and *Turbincarpus laui* (*Tl*). To increase metabolite content, the callus was irradiated with UV light and cellular suspensions were exposed to chitosan. Antioxidant activity was determined by FRAP and TBRAS assays, and the anti-inflammatory activity by quantifying TNF α using two acute inflammation models. The results showed that *Mc* and *Tl* metabolites have antioxidant activity similar or superior to vitamin E, and an anti-inflammatory activity (*in vivo* and *in vitro*) major to indomethacin. In conclusion, the *in vitro* cultures from *Mc* and *Tl* are a source of antioxidants and anti-inflammatory metabolites.

Keywords: Antioxidant activity, anti-inflammatory activity, *in vitro* cultures, *Mammillaria candida*, *Turbincarpus laui*

Índice

Agradecimientos.....	vi
Dedicatoria	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Índice de cuadros	xiv
Índice de figuras	xv
I. Introducción.....	1
1.1 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo	1
1.2 Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT).....	3
1.3 Inflamación.....	4
1.4 Importancia de los antioxidantes.....	6
1.5 Productos naturales y fitofármacos	7
1.6 Métodos para evaluar actividad antioxidante y antiinflamatoria	8
1.7 Cactáceas como fuente de metabolitos	9
1.8 Cultivo de tejidos vegetales (CTV)	11
1.8.1 Auxinas	11
1.8.2 Citocininas	13
1.8.3 Etapas de CTV.....	13
1.8.4 Tejido no diferenciado para la obtención de compuestos bioactivos	14
1.8.5 Inducción de los metabolitos en el cultivo <i>in vitro</i>	15
II. Antecedentes	19
III. Justificación e Hipótesis	23
3.1 Justificación	23

3.2 Hipótesis	24
IV. Objetivos	24
4.1 General	24
4.2 Particulares	24
V. Metodología	25
5.1 Producción de metabolitos en callos de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i>	25
5.1.1 Condiciones de cultivo de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i>	25
5.1.2 Establecimiento de suspensiones celulares.....	25
5.1.3 Inducción del estrés biótico con quitosano.....	25
5.1.4 Inducción del estrés abiótico con luz UV.....	26
5.2 Extracción de compuestos fenólicos	26
5.3 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i>	27
5.3.1 Ensayo FRAP.....	27
5.4 Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vivo</i> de los extractos de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i> a través de la inhibición de la peroxidación lipídica (MDA).	28
5.4.1 Ensayo de TBARS.....	28
5.5 Evaluación de la capacidad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de los extractos hidroalcohólicos de las especies vegetales en células polimorfonucleares de rata <i>Wistar</i>	29
5.5.1 Modelo <i>in vitro</i> de inflamación aguda.....	29
5.6 Evaluación de la capacidad antiinflamatoria <i>in vivo</i> de los extractos hidroalcohólicos de las especies vegetales en ratas macho de la cepa <i>Wistar</i>	31
5.6.1 Modelo <i>in vivo</i> de inflamación aguda	31
5.6.2 Cuantificación de la secreción de TNF α	33

5.7 Análisis estadístico.....	34
VI. Resultados y discusión	35
6.1. Propagación de callos y suspensiones de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i>	35
6.2 Inducción y rendimiento de los metabolitos secundarios en callos de <i>M. candida</i> y <i>T.laui</i> mediante estrés biótico (quitosano) y abiótico (radiación UV).....	36
6.2.1 Inducción de estrés biótico y abiótico	36
6.2.2 Extracción de compuestos fenólicos	38
6.3 Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP	39
6.4 Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	42
6.5 Actividad antioxidante y antiinflamatoria <i>in vivo</i>	47
VII. Conclusiones	54
VIII. Bibliografía	55

Índice de cuadros

Cuadro 1. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de metabolitos identificados en callos y suspensiones estresados de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i> .	22
Cuadro 2. Diseño experimental de inflamación aguda <i>in vitro</i> .	31
Cuadro 3. Peso fresco y seco, peso de extracto y porcentaje de rendimiento de extracción de cultivos <i>in vitro</i> de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i> .	38

Índice de figuras

Figura 1. Formación de EROS y peroxidación de lípidos	2
Figura 2. Mecanismo de señalización para la síntesis de metabolitos secundarios inducido por elicitores	18
Figura 3. Aspecto de callos de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i>	35
Figura 4. Suspensiones de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i>	36
Figura 5. Estrés biótico y abiótico en callos y suspensiones de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i>	37
Figura 6. Filtración y apariencia de los extractos hidroalcohólicos de suspensiones y callos, control y estresados, de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i>	38
Figura 7. Ensayo FRAP	40
Figura 8. Actividad antioxidante (FRAP) de los extractos de los cultivos de <i>T. laui</i> y <i>M. candida</i>	41
Figura 9. Curva dosis-respuesta de extractos más activos de cultivos de <i>M.candida</i>	43
Figura 10. Curva de calibración TNF α	43
Figura 11. Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de extractos de cultivos de callos y suspensiones de <i>M. candida</i> y <i>T. laui</i> (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en células PMN de bazo de rata estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 12 h)	45
Figura 12. Curva dosis-respuesta en la concentración de TNF α secretada por las células PMN de bazo de rata (estimadas con LPS, 1	46

$\mu\text{g mL}^{-1}$) tratadas con los extractos de cultivo de callos y suspensiones de *M. candida* y *T. laui*

Figura 13. Concentración de $\text{TNF}\alpha$ secretada por las células PMN de bazo de rata (sin estímulo de inflamación) tratadas con los extractos de cultivo de callos y suspensiones de *M. candida* y *T. laui* 47

Figura 14. Curva de calibración de malondialdehído (MDA) para ensayo TBARS 48

Figura 15. Cuantificación de MDA en el suero de rata macho *Wistar* con inducción de inflamación con carragenina 1 % 50

Figura 16. Actividad antiinflamatoria *in vivo* de extractos de cultivo *in vitro* de *M. candida* 51

Figura 17. Mecanismo de acción de metabolitos mayoritarios en extractos de callos irradiados y suspensiones control de *M. candida* 53

I. Introducción

1.1 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son compuestos que presentan en su estructura una o más moléculas de oxígeno parcialmente reducidas y altamente oxidantes, las cuales pueden ser radicalarias como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), los radicales hidroxilos ($\cdot OH$), perhidroxilo ($HO_2^{\cdot-}$), peroxilo ($RO_2^{\cdot-}$) y alcoxilo ($RO\cdot$) y no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete (1O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e hidroperóxido ($ROOH$). Es importante mencionar que las EROS no radicalarias son altamente prooxidantes, dado que son intermediarios para formar radicales libres (Martínez Sánchez, 2000; Camps *et al.*, 2010).

Las EROS se forman en las células como resultado del metabolismo aeróbico, activación de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, acción de los peroxisomas, por la actividad de NADPH oxidasa, citocromo P450 dependiente de oxigenasas y la xantina oxidasa (Carvajal, 2019). Las EROS también se generan por factores externos, como la contaminación ambiental, radiación ionizante (luz UV, rayos X y rayos gamma) y condiciones extremas de temperatura (Martínez-Sánchez, 2005; Carvajal, 2019).

Las EROS se producen por la transferencia de electrones, mediante una serie de reacciones de oxidación y reducción del oxígeno, que puede ocurrir vía enzimática y no enzimática. En primer lugar, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se forma por la reducción de un electrón del oxígeno, por acción enzimática de la NADPH oxidasa, citocromo P450 dependiente de oxigenasas o la xantina oxidasa. Posteriormente la enzima superóxido dismutasa convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (Turrens, 2003; Martínez-Sánchez, 2005). Los radicales hidroxilos se forman mediante la reacción de Fenton y Haber-Weiss, utilizando el Fe^{+3} como catalizador donde, primeramente, se lleva a cabo una reacción de oxido-reducción entre el anión superóxido y el Fe^{+3} , resultando como productos el Fe^{+2} y O_2 . Posteriormente, el hierro reducido (Fe^{+2})

reacciona con el peróxido de hidrógeno produciendo el radical hidroxilo (Kehrer, 2000). Dichas reacciones se resumen en la Figura 1a.

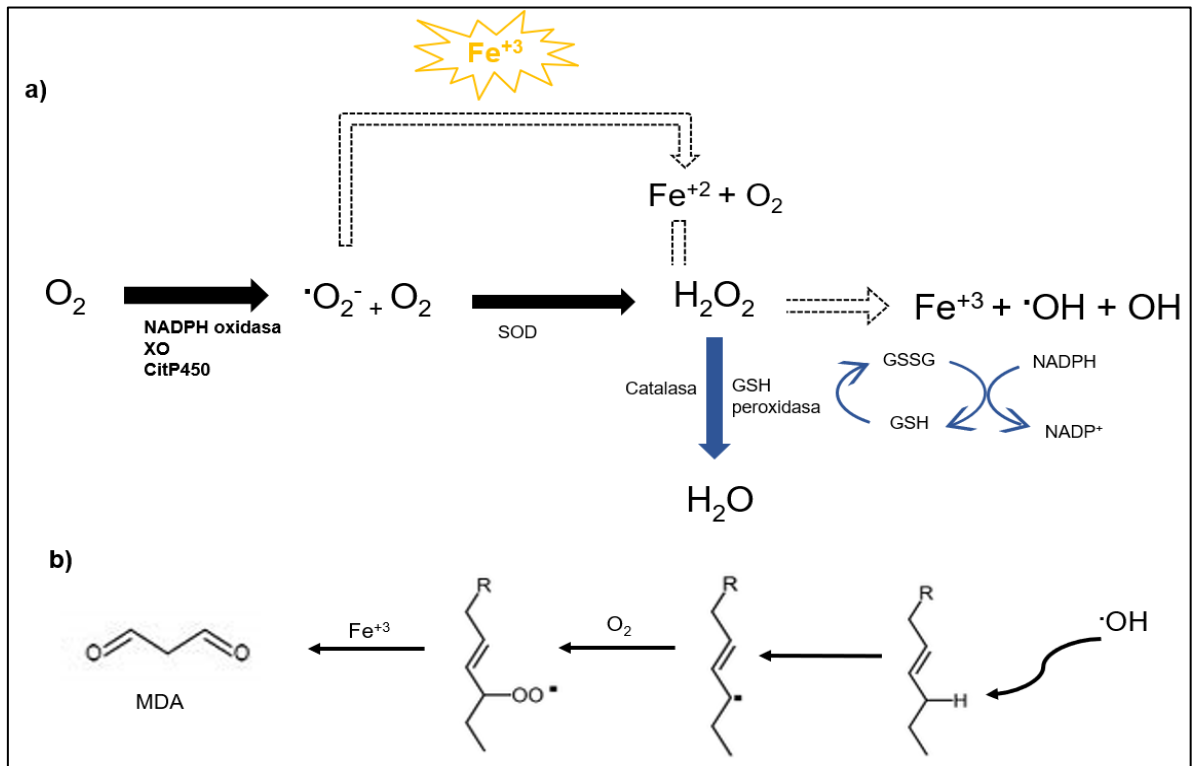


Figura 1. Formación de EROS y peroxidación de lípidos. a) Formación de EROS y reacción de Fenton y Haber-Weiss (línea punteada). El O_2 , por acción de las enzimas NADPH oxidasa, citocromo P450 dependiente de oxigenasas o xantina oxidasa, genera el anión superóxido. La SOD cataliza la dismutación de O_2^- para producir H_2O_2 , el cual por acción de la glutatión peroxidasa y catalasa produce agua y oxígeno. En la reacción de Fenton y Haber-Weiss, el O_2^- se oxida a O_2 y el Fe^{+3} se reduce a Fe^{2+} . El Fe^{2+} se oxida al reaccionar con el H_2O_2 para producir $\cdot OH$. b) Peroxidación lipídica, formación de MDA. El radical $\cdot OH$ abstrae un e^- del hidrógeno metilénico, produciendo el radical lipídico y con acción de O_2 se genera el radical peroxilo. El radical peroxilo en presencia de un metal (Fe^{+3}) genera malondialdehído.

El radical $\cdot OH$ es el radical libre más reactivo que se conoce y el oxidante más potente de los sistemas biológicos. Es capaz de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas, como los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) de la membrana plasmática, en donde atacan un átomo de hidrógeno metilénico del ácido graso (AG), generando

un radical lipídico. El radical lipídico, a su vez, reacciona con una molécula de oxígeno, originando los radicales peroxilos y alcoxilos lipídicos, los cuales extraen otro átomo de hidrógeno del AG, generando un nuevo radical lipídico. Se producen así reacciones en cadena que ocasionan la peroxidación lipídica (Figura 1b) (Martínez-Sánchez, 2005).

La peroxidación lipídica produce pérdida de la fluidez de la membrana, alteraciones en las funciones secretoras y en los gradientes iónicos. El radical peroxilo, en presencia de metales como el hierro o cobre, se degrada produciendo compuestos como el malondialdehído (MDA) (Figura 1b), que pueden alterar la permeabilidad vascular y desencadenar la reacción inflamatoria. El MDA también estimula a la fosfolipasa A2 e induce la liberación de ácido araquidónico, relacionado con el proceso inflamatorio (Martínez-Sánchez, 2005; Londoño-Londoño, 2011).

La concentración de EROS es regulada por los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos del organismo. En el primer grupo se encuentran las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, que en conjunto participan en la conversión de superóxido a peróxido y posteriormente a agua (Figura 1) (Lozano Casanova *et al.*, 1997; Cassells y Curry, 2001).

Un déficit de los sistemas antioxidantes contribuye a la formación descontrolada de EROS y como consecuencia se genera un estrés oxidativo (EO) (Carvajal, 2019). El EO causa alteraciones en el ADN y proteínas intracelulares, además de oxidar los lípidos de membrana (Carvajal, 2019). Las alteraciones ocasionadas por el EO pueden llevar al deterioro funcional de órganos y sistemas, lo que favorece el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (Sen y Packer, 1996; Nediani y Giovannelli, 2020).

1.2 Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)

Son un grupo de enfermedades que se caracterizan por tener una larga duración y lenta progresión. Las ECNT engloban enfermedades como cáncer, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer y Parkinson;

enfermedades cardiovasculares, como ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares y enfermedades respiratorias crónicas, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Nediani y Giovannelli, 2020).

Las ECNT están clasificadas como una emergencia sanitaria a nivel mundial, dado que, con el paso de los años, el número de casos de ECNT ha ido en aumento (Narro-Robles, 2018) y son responsables del 74 % de muertes que se producen anualmente (OMS, 2022). De hecho, las enfermedades cardiovasculares representan el mayor riesgo de muertes, con reporte de 17.9 millones al año, seguido del cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes (OMS, 2022). Particularmente, en México, las enfermedades cardiovasculares, neurológicas, diabetes mellitus, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la enfermedad renal crónica constituyen una de las principales causas de muerte (Narro-Robles, 2018).

Es importante mencionar que las ECNT tienen como factor común, además de la presencia de EROS, el desarrollo de procesos inflamatorios (Nediani y Giovannelli, 2020). En este sentido, dentro de las ECNT, ha tomado gran relevancia el concepto de “metainflamación” ya que señala que un estado de inflamación crónico produce una cascada metabólica, que incluye el estrés oxidativo celular, aterosclerosis y resistencia a la insulina (Koch, 2019; Itoh *et al.*, 2022) . Por lo antes mencionado, el estrés oxidativo y la inflamación se han reportado como factores importantes que participan en la progresión de las ECNT y pueden ser puntos clave para el desarrollo de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas (Karam *et al.*, 2017; Nediani y Giovannelli, 2020).

1.3 Inflamación

La inflamación se define como la respuesta del organismo ante algún tipo de daño, ya sea a células o tejidos, con el objetivo de fagocitar o eliminar al patógeno. Los cuatro signos de la inflamación son rubor y calor (en respuesta al incremento del flujo sanguíneo), edema, producido por incremento de la permeabilidad vascular, y dolor. La inflamación puede ser aguda o crónica, en la primera se ve implicada la inmunidad

innata, mientras que en la segunda participa la inmunidad adaptativa (Kindt *et al.*, 2007).

El proceso inflamatorio conlleva una cascada de señalización en donde participan las células del sistema inmune (mastocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos), citocinas (quimiocinas, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF, INF- λ), proteínas plasmáticas (proteína C reactiva, lectina de unión a manosa y sistema de complemento) y mediadores inflamatorios (histamina, tromboxano, leucotrienos, prostaglandinas) (Kindt *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2014).

En la cascada inflamatoria, primeramente, los macrófagos, mastocitos y células dendríticas tisulares son activados por la unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como lipopolisacáridos (LPS), o patrones asociados a daño (DAMP) a los receptores tipo toll (TLR) en la membrana de las células tisulares. Posteriormente, la activación de los macrófagos transloca el factor de transcripción kappa beta (NF κ β) del citoplasma al núcleo, induciendo la síntesis de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-1, IL-12, IL-6, IL-8) y quimiocinas. Al mismo tiempo, los mastocitos sintetizan mediadores inflamatorios (histamina, leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas) por la unión del complemento (C3a y C5a) a sus receptores (Kindt *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2014).

El TNF α , la IL-1 β , las quimiocinas y los mediadores inflamatorios ocasionan una vasodilatación; debido al incremento del flujo sanguíneo, la permeabilidad capilar, la migración de leucocitos por quimiotaxis y la extravasación de estos, particularmente neutrófilos y monocitos, para llegar al sitio de infección. Además, las IL-6, IL-1 β y el TNF α estimulan a los hepatocitos para producir proteínas plasmáticas (proteína C reactiva, lectina de unión a manosa y el sistema de complemento), conocidas como proteínas de reacción de fase aguda, que contribuyen a la defensa del huésped, mediante la opsonización de patógenos para que sean fácilmente reconocidos y fagocitados (Kindt *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2014).

Los neutrófilos y macrófagos tienen una importante función en el proceso inflamatorio, ya que además de sintetizar citocinas proinflamatorias, tienen función fagocítica para eliminar a los patógenos. Los fagocitos, una vez activados, matan microorganismos mediante un ataque oxidativo y no oxidativo. El segundo involucra la presencia de proteínas antimicrobianas, proteasas y lisozima. El ataque oxidativo involucra la generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en el fagosoma por activación de la enzima oxidasa fagosómica de NADPH (Kindt *et al.*, 2007).

1.4 Importancia de los antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que ayudan a mantener el equilibrio redox en el organismo, ya que funcionan como captadores de especies reactivas de oxígeno. Éstos compuestos pueden ceder electrones o átomos de hidrógeno a los oxidantes y de esta forma detener las reacciones en cadena y los daños ocasionados por los radicales libres (Berger *et al.*, 2012; Sies, 2015). En experimentos con modelos *in vitro* e *in vivo*, se ha destacado la importancia de los antioxidantes exógenos para prevenir ECNT, tales como hipertensión, enfermedades cardiovasculares, cáncer, síndrome metabólico, arteriosclerosis y enfermedades neurodegenerativas (Ahmad *et al.*, 2017; Koch, 2019; Ullah *et al.*, 2020).

Las plantas son ricas en compuestos antioxidantes, como alcaloides, terpenos, y polifenoles, ácidos fenólicos, cumarinas, antraquinonas, xantonas, estilbenos, lignanos y flavonoides (Coronado *et al.*, 2015; Koch, 2019). La vitamina E, el ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides y ácidos fenólicos, como el ácido gálico, son metabolitos ampliamente reconocidos por su alta capacidad antioxidante (Londoño-Londoño, 2011). Particularmente los compuestos fenólicos, como los flavonoides, se han reportado no únicamente como antioxidantes, sino también como potenciales antiinflamatorios, mediante la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas (COX-1, COX-2), lipooxigenasa (5-LOX), y citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 (Jiang, 2014; Chanput *et al.*, 2016; Koch, 2019; Ullah *et al.*, 2020).

1.5 Productos naturales y fitofármacos

Los productos naturales o metabolitos secundarios son compuestos que producen los organismos vivos (plantas, animales, hongos o bacterias), como mecanismo de defensa a los cambios de temperatura, sequía, salinidad, ataque de otros organismos, etc (Agostini-Costa et al., 2011). Dentro de los productos naturales que producen dichos organismos, se encuentran metabolitos como alcaloides, terpenos, flavonoides y ácidos fenólicos, a los cuales se les han atribuido múltiples actividades biológicas, como: antioxidante, larvicida, fungicida, antibacteriano, anticancerígeno, entre otros. Por ello, el uso de los productos naturales ha incrementado en distintos campos, como son la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica e inclusive, se recomienda ampliar su uso en la veterinaria y agricultura (Chiocchio et al., 2021).

El uso de las plantas como fuente de antioxidantes y nutracéuticos ha incrementado notablemente en los últimos años, (Scossa et al., 2018), por lo que la OMS (WHO, por sus siglas en inglés) considera a la medicina tradicional (basada en el uso de extractos de plantas, entre otros) como un pilar de la prestación de servicios de salud y como complemento, para la prevención y manejo de enfermedades crónicas relacionadas con el estilo de vida de la población (WHO, 2019). Entre éstas se pueden mencionar desórdenes cardiovasculares, gastrointestinales, cáncer, problemas neurológicos y afecciones al esqueleto (Popović et al., 2016).

Numerosos reportes describen el aislamiento de diferentes metabolitos como digoxina, el taxol y la artemisina, obtenidos de las especies *Digitalis lanata*, *Taxus brevifolia* y *Artemisia annua*, efectivos para tratar arritmias cardíacas, cáncer y paludismo, respectivamente (Paine y Roe, 2018). Sin embargo, en el caso de enfermedades que afectan a múltiples tejidos o tipos de células, como las ECNT (Zimmermann et al., 2007) puede requerirse de la acción sinérgica de dos o más compuestos para observar un efecto terapéutico (Schmidt et al., 2008).

Los fitofármacos, también llamados drogas vegetales (DV), son extractos de plantas empleados para el tratamiento de enfermedades, tienen una mezcla de compuestos,

que pueden tener múltiples dianas farmacológicas. También se ha descrito que los metabolitos pueden interactuar entre ellos para dar una mejor actividad (efecto potenciado). En el 2004, la FDA estableció una guía para el desarrollo de las DV a fin de garantizar su seguridad y eficacia mediante ensayos pre-clínicos y clínicos (Ahn, 2017). Algunas de las DV aprobadas por la FDA para venta con prescripción son Verengen® (sinecatequinas) y Mytesi™ (crofelemer). Las DV que contienen la cáscara de *Psyllium* y Senna, se encuentran en revisión para su venta libre (FDA, 2022).

1.6 Métodos para evaluar actividad antioxidante y antiinflamatoria

Los métodos antioxidantes (MAO), miden la eficacia de una sustancia antioxidante para aminorar la degradación oxidativa (Shahidi y Zhong, 2015). Actualmente, existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante de un extracto o compuesto, los cuales se diferencian en el tipo de sustrato empleado, los oxidantes, los mecanismos de reacción y las condiciones del ensayo (Shahidi y Zhong, 2015). De acuerdo al tipo de ensayo antioxidante empleado, se puede identificar el mecanismo y cinética de las reacciones del compuesto antioxidante (Amorati y Valgimigli, 2018).

Los métodos antioxidantes se clasifican en dos grupos, de acuerdo con su mecanismo de reacción. En el primer grupo se incluyen los métodos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH) y en el segundo, los métodos enfocados en la transferencia de electrones (TE) (Huang *et al.*, 2005). En el grupo TAH se encuentran los métodos ORAC (capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno, por sus siglas en inglés) y TRAP (parámetro total de atrapamiento de radicales, por sus siglas en inglés) y en el segundo grupo se incluyen los métodos FRAP (capacidad para reducir el hierro férrico) y CUPRAC (capacidad antioxidante reductora cúprica) (Shahidi y Zhong, 2015).

Algunos métodos combinan ambos mecanismos, tales como el ensayo de DPPH y ABTS, dado que se fundamentan en la estabilización de radicales sintéticos, los cuales pueden ser estabilizados por la transferencia de un electrón o un átomo de hidrógeno del compuesto antioxidante (Shahidi y Zhong, 2015). Por otro lado, existen algunos

métodos que no se clasifican en ninguno de los dos grupos descritos anteriormente; estos métodos se fundamentan en la medición de productos de oxidación, como son los ensayos de TBARS, medición de radicales libres, valor de peróxido y *p*-anisidina, entre otros (Shahidi y Zhong, 2015).

Los métodos para medir la actividad antiinflamatoria se pueden enfocar en la medición de proteínas que son liberadas en el proceso inflamatorio, como pueden ser enzimas (ciclooxigenasa, lipooxigenasa), mediadores inflamatorios (histamina, tromboxano, leucotrienos, prostaglandinas) y citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF, INF- λ), además del NF κ B (Dinarello, 2010).

Los ensayos para evaluar la actividad antiinflamatoria consisten en inducir la inflamación en algún modelo de experimentación, ya sea en animales como ratas o ratones, o bien en líneas celulares. Dentro de los modelos con animales se encuentra la inducción del edema en pata de rata inducido con carragenina, aceite de crotón o etilfenilpropiolato, el método del plato caliente, la inducción de granuloma por pastilla de algodón y la inducción de inflamación con LPS ya sea administrado intraperitoneal o estimulando a líneas celulares (Azab *et al.*, 2016).

Dentro de los agentes inductores de la inflamación más empleados, se destaca la carragenina y el LPS, ya que son inductores de EROS y han sido empleados en múltiples estudios para evaluar actividad antioxidante y antiinflamatoria de extractos (Azab *et al.*, 2016; Bottamedi *et al.*, 2021). Es importante mencionar que los ensayos antioxidantes se han empleado como marcadores para evaluar de la actividad antiinflamatoria, dado que se ha encontrado una correlación negativa entre la actividad antioxidante y la concentración de citocinas proinflamatorias (Chanput, Krueyos, y Ritthiruangdej, 2016).

1.7 Cactáceas como fuente de metabolitos

Las cactáceas, pertenecen al reino Plantae y a la familia Cactaceae. Son plantas perennes y xerófitas, es decir son resistentes a condiciones de poca agua (Schulze-Rojas, 2004) Realizan el metabolismo ácido de las crasuláceas (metabolismo CAM),

que les permite fijar el CO₂ durante la noche y mantener cerrados las estomas durante el día, para evitar la pérdida de agua (Altesor y Ezcurra, 2003). Estas plantas se pueden clasificar de acuerdo a la morfología de su tallo como columnares, cilíndricos, candelabro, cladodios y globulares (Bravo-Hollis, 1978; Altesor y Ezcurra, 2003).

Las cactáceas son plantas originarias de América, que se distribuyen en Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Perú, Chile, Brasil, Bolivia y Argentina (Ortega-Baes y Godínez-Alvarez, 2006). México es el país que alberga la mayor riqueza de cactáceas, con 669 especies; de éstas, 518 especies son endémicas (Santos-Díaz *et al.*, 2011; SEMARNAT, 2018). Particularmente, el estado de San Luis Potosí posee la mayor diversidad, con 151 especies (SEMARNAT, 2018).

Las cactáceas se han usado en México desde tiempos ancestrales y hasta la actualidad, en la medicina tradicional. Por ejemplo, en algunas comunidades de Puebla y Yucatán se emplea la parte aérea de *Pachycereus marginatus* para tratar la diarrea (Hernández *et al.*, 2003); los tallos y raíces de *Lophophora williamsii* para la artritis; las raíces de *Echinocereus poseelgresi* para aliviar el dolor y los tallos de *Achanthocereus tetragonus* y frutos de *Cylindropuntia* en el tratamiento de la diabetes (Estrada-Castillón *et al.*, 2018).

Otros reportes han descrito que las cactáceas poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Trout, 2014; Santos-Díaz y Camarena-Rangel, 2019; Das *et al.*, 2020). Estas propiedades farmacológicas se han relacionado a la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos (Trout, 2014; Santos-Díaz y Camarena-Rangel, 2019; Das *et al.*, 2020).

Aunque las cactáceas son fuente de metabolitos su explotación comercial presenta limitantes como el lento crecimiento y periodo de reproducción, las semillas presentan bajo vigor y lenta germinación (Santos-Díaz *et al.*, 2011). Además, la reducción de las poblaciones naturales debido a la devastación de su hábitat ha originado que muchas cactáceas se encuentren en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) y estén consideradas como raras, vulnerables

y en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010. Una alternativa para obtener los compuestos bioactivos de las cactáceas, sin afectar sus poblaciones naturales, es el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro*.

1.8 Cultivo de tejidos vegetales (CTV)

El cultivo de tejidos vegetales se define como el cultivo de células, tejidos y órganos en medios de cultivo nutritivos definidos, en condiciones asépticas y ambientes controlados de temperatura, luz y pH. A través de esta técnica es posible propagar cientos o miles de plantas en un periodo menor de tiempo, comparado con las técnicas de cultivo convencionales, obtener plantas libres de enfermedades y con mejores características agronómicas (Espinosa-Leal *et al.*, 2018; Santos-Díaz y Camarena-Rangel, 2019).

El medio de cultivo le provee al tejido vegetal los nutrientes para su crecimiento. Los medios de cultivo más utilizados son el medio Murashige-Skoog (MS), el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) y el medio B5 de Gamborg (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). En general, los medios de cultivo contienen macronutrientes como nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y sulfuro; micronutrientes como hierro, níquel, cloro, manganeso, zinc, boro, cobre y molibdeno; una fuente de carbono como sacarosa o glucosa; vitaminas como tiamina y piridoxina; y reguladores de crecimiento como auxinas y citocininas (George *et al.*, 2008).

1.8.1 Auxinas

Las auxinas inducen la replicación del ADN promoviendo el crecimiento de tejidos no diferenciados (callos), formación de embriones y raíz. Pueden ser naturales como el ácido indol acético (AIA), ácido indol butírico, o sintéticas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (George *et al.*, 2008). La biosíntesis de las auxinas proviene del aminoácido indólico triptófano (Trp). La principal auxina en las plantas es el ácido indol acético la cual puede sintetizarse por 3 vías. La primera es la vía de

indolpiruvato, la segunda la ruta del indol-3-acetaldoxima y la tercera la ruta de la triptamina (George *et al.*, 2008).

La ruta más conocida es la del indolpiruvato, que comienza con la transaminación del Trp catalizado por la enzima triptófano transaminasa para obtener el indolpiruvato. El indolpiruvato se descarboxila por la indolpiruvato descarboxilasa y el producto, indol acetaldehído, se reduce por la enzima acetaldehído deshidrogenasa, para obtener el ácido indol acético (George *et al.*, 2008).

Las auxinas presentan un transporte polar, que involucra un movimiento desde el ápice hasta el base (basípetal) o de la base al ápice (acrópetal). Las auxinas se pueden encontrar en un estado protonado (AIAH) y aniónico (AIA-), el primero puede atravesar la membrana plasmática y disociarse dentro de la membrana por el cambio de pH (pH 7), mientras que AIA- necesita del transportador de entrada AIA- para atravesar la membrana plasmática (Perrot-Rechenmann y Napier, 2005).

En la membrana, las auxinas pueden unirse a proteínas ABP o salir a través de los transportadores de salida PIN y PGP1/PGP19, estos últimos transportadores requieren de energía. Las proteínas transportadoras de entrada (AUX1) y de salida (PIN 1 y PGP1/PGP19), las proteínas ABP y la velocidad de biosíntesis, determinarán la concentración de las auxinas dentro de la célula (Perrot-Rechenmann y Napier, 2005).

Cuando hay altos niveles de auxinas en la célula, se produce la degradación de la proteína de represión AUX/IAA. Para la degradación de AUX/IAA, primero se forma el complejo auxina-AUX/IAA que se unen a las proteínas TIR1, favoreciendo la ubiquitinación. El complejo ubiquitinado, se envía al sistema proteosoma para la degradación de las proteínas AUX/IAA y de esta forma quedan libres los factores de respuesta a auxinas (ARF), favoreciendo la expresión de genes involucrados con las funciones de las auxinas (Perrot-Rechenmann y Napier, 2005).

1.8.2 Citocininas

Las citocininas son reguladores de crecimiento que inducen la expresión de ciclinas D3, dando lugar a la mitosis, favoreciendo el desarrollo de brotes laterales y expansión de las hojas, también retrasan la senescencia de las hojas y previenen el rompimiento de la clorofila. Las citocinas naturales incluyen zeatina, dihidrozeatina, trans zeatina; las sintéticas son benciladenina, cinetina, tidiazuron. Las citocinas naturales se sintetizan a partir del dimetil alil pirofosfato (DMAPP) proveniente de la ruta del mevalonato (George *et al.*, 2008).

La cascada de señalización de las citocininas comienza con la unión de la citocinina a proteínas receptoras tipo histidina-quinasa (AHK2, AHK3, CRE1, AHK4). Esta unión provoca la fosforilación de la región conservada de las proteínas quinasa y fosforila a proteínas AHPs. El complejo fosforilado de citocina-proteínas cinasa pasa del citoplasma al núcleo, donde las proteínas AHPs fosforilan los factores de transcripción ARR, activándolos. Se describen dos tipos de proteínas ARR, los ARR tipo A y tipo B. Las ARR tipo A expresan genes relacionados con la función del meristemo, ritmo circadiano y función del fitocromo; mientras que las de tipo B expresan genes relacionados con el desarrollo de brotes, raíz, hoja, diferenciación vascular y senescencia (Ferreira y Kieber, 2005).

1.8.3 Etapas de CTV

Las etapas del CTV involucran la selección del explante, asepsia, multiplicación, enraizamiento y aclimatación.

Etapa 0: Selección de explante y preparación de planta donadora. El explante puede ser cualquier tejido u órgano (hoja, meristemo apical, brote o raíz) de una planta saludable y vigorosa. Para mejorar la probabilidad de éxito, la planta madre puede ser cultivada *ex vitro*, bajo condiciones óptimas para minimizar la contaminación.

Etapa 1 iniciación: asepsia del explante y posterior transferencia a medio de cultivo. La asepsia es un paso crucial para eliminar contaminantes con un daño mínimo al

explante. Los desinfectantes más empleados son hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, etanol al 70 %, cloruro de mercurio y peróxido de hidrógeno. En cuanto al medio de cultivo, se añaden reguladores de crecimiento como citocininas para inducir la formación de tejido diferenciado, o bien, el empleo de auxinas o auxinas: citocininas (10:1) para la inducción de tejido no diferenciado.

Etapa 2 multiplicación: en esta fase, se realizan subcultivos para incrementar el número de propágulos.

Etapa 3 inducción de la raíz: esta etapa puede realizarse en el medio basal o añadir algún regulador de crecimiento, como auxinas para inducir el desarrollo de la raíz.

Etapa 4 aclimatación: se realiza de forma gradual, de un ambiente de alta a baja humedad y de baja a alta intensidad de la luz, para adaptar a la planta a las condiciones *ex vitro*. Las plantas son transferidas a macetas con un sustrato adecuado (arena, turba, vermiculita, etc.) y adaptadas a condiciones de invernadero (George *et al.*, 2008; Leva y Rinaldi, 2012).

1.8.4 Tejido no diferenciado para la obtención de compuestos bioactivos

El tejido no diferenciado, conocido como callo, se forma cuando las células se multiplican de forma desorganizada. Al igual que la planta completa, los callos sintetizan metabolitos secundarios que pueden ser de interés farmacológico, por lo que se han considerado una estrategia para la obtención de compuestos bioactivos. Una de las ventajas de este sistema es que se pueden obtener metabolitos de interés sin sacrificar la planta, lo que permite acelerar el proceso de obtención, ya que no es necesario esperar a que desarrolle la planta completa (Efferth, 2019).

A través del cultivo de callos se han obtenido diferentes metabolitos secundarios con actividad farmacológica. Por ejemplo, los extractos de callo de las especies *Stenocereus queretaroensis* y *Leuchtenbergia principis* presentaron actividad antimicrobiana contra las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aerus* (Gutierrez-Rojo, 1993). El extracto metanólico de callo de *Astrophytum myriostigma* mostró

actividad amebicida contra *Entamoeba histolytica* y antioxidante mediante el ensayo de DPPH, con una concentración inhibitoria media (CI₅₀) menor de 100 µg mL⁻¹ y una concentración efectiva media (CE₅₀) de 199.19 µg mL⁻¹, respectivamente (Garza-Padrón *et al.*, 2010).

El perfil fitoquímico reveló la presencia de triterpenos, esteroides, carbohidratos, alcaloides, ácidos fenólicos y flavonoides. Cabe mencionar que los metabolitos presentes en el tallo de la planta de *Astrophytum myriostigma* tuvieron menor actividad antioxidante, comparado con el cultivo *in vitro* y no sintetizaron ácidos fenólicos y flavonoides (Garza-Padrón *et al.*, 2010). En otro estudio, los extractos etanólicos de callo de las especies *Opuntia streptacantha*, *O. megacantha* y *O. ficus-indica* exhibieron mayor actividad antioxidante y mayor contenido de compuestos fenólicos y de flavonoides que la penca (Robles-Martínez *et al.*, 2016).

1.8.5 Inducción de los metabolitos en el cultivo *in vitro*

Los elicitores o potenciadores son agentes físicos, químicos o biológicos que pueden desencadenar una reacción de hipersensibilidad en las plantas y se dividen en bióticos y abióticos. Los potenciadores bióticos incluyen componentes de la pared de hongos, bacterias, sales, jasmonato, etileno, y los abióticos corresponden a temperatura, metales pesados, luz UV y presión osmótica (Zhao *et al.*, 2005). La aplicación de elicitores en el CTV permite incrementar el rendimiento de metabolitos, ya que inducen la expresión de genes en respuesta al estrés inducido (Efferth, 2019).

La unión del elicitador a receptores específicos en la membrana plasmática de la planta origina una cascada de transducción de señales. La síntesis de metabolitos de defensa comienza con la unión del elicitador a receptores específicos en la membrana plasmática, lo que activa diversos mensajeros. En primera instancia, la unión elicitador-receptor activa a las proteínas G (GTP), que a su vez activa a la fosfolipasa C (PLC); dicha enzima hidroliza enlaces fosfodiéster de los fosfolípidos, como el ácido linolénico que conlleva a la síntesis de ácido jasmónico (AJ). El AJ actúa como una molécula de

señalización para la inducción de genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios (Efferth, 2019).

Por otro lado, la PLC también hidroliza el fosfatidil inositol difosfato (PIP₂) produciendo inositol trifosfato (IP3) y diacil glicerol (DAG), este último activa a las proteínas cinasas C (PKC) que activan proteínas mediante fosforilación. Mientras que el IP3 activa canales de calcio, incrementando así, la concentración de Ca⁺² intracelular (Narayani y Srivastava, 2017). El calcio activa a la proteína calmodulina que estimula a proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPK). Éstas proteínas cinasas fosforilan enzimas relacionadas con la síntesis de metabolitos secundarios (Zhao *et al.*, 2005; Narayani y Srivastava, 2017).

Por otro lado, el calcio activa la NADPH oxidasa, que cataliza la conversión de oxígeno al anión superóxido y posteriormente, la producción de peróxido de hidrógeno. El H₂O₂ ingresa a la célula y a bajas concentraciones, funciona como una molécula señalizadora para la inducción de la transcripción de proteínas implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios. La unión elicitor-receptor, también activa canales antiport H⁺/K⁺ Cl⁻. La entrada de H⁺ y salida de iones K⁺ y Cl⁻ origina la alcalinización del medio y la acidificación del citoplasma; esta disminución del pH es un paso crucial en la transducción de señales, dando lugar a la síntesis de metabolitos secundarios (Zhao *et al.*, 2005; Narayani y Srivastava, 2017)

La unión del elicitor a su receptor también activa proteínas MAPK, estas enzimas pueden fosforilar proteínas implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios y así promover su producción. De igual forma, originan la síntesis de ácido jasmónico y etileno, segundos mensajeros para la síntesis de metabolitos secundarios (Zhao *et al.*, 2005; Narayani y Srivastava, 2017). En la Figura 2 se esquematiza el mecanismo de señalización que genera el elicitor dando lugar a la síntesis de metabolitos de defensa.

En cuanto a la elicitación con luz UV, se han descrito tres mecanismos mediante los cuales esta irradiación induce la síntesis de metabolitos secundarios. El primero es la activación de las proteínas cinasas (MPK3/MPK6), las cuales activan factores de

transcripción para la síntesis de metabolitos secundarios. La segunda es la ruta de UVR8; esta es una proteína enriquecida en triptófano, aminoácido aromático que absorbe la luz UV (cromóforo) (Chandra *et al.*, 2012).

El UVR8 se encuentra en su forma inactiva como dímero y es monomerizado (forma activa) cuando el cromóforo (Trp-285) capta la luz UV. El UVR8 activo interacciona con la proteína COP1, comenzando la transducción de señales para la síntesis de enzimas que participan en la formación de metabolitos secundarios, particularmente flavonoides. La tercera ruta es mediante la formación de EROS, ya que a bajas concentraciones funciona como molécula de señalización para control de la muerte celular, respuestas de hormonas y otros procesos celulares. La radiación UV activa a la NADPH oxidasa, dando lugar a la formación de EROS y estos a su vez inducen la síntesis de ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno, que funcionan como moléculas señalizadoras para la síntesis de metabolitos secundarios (Chandra *et al.*, 2012).

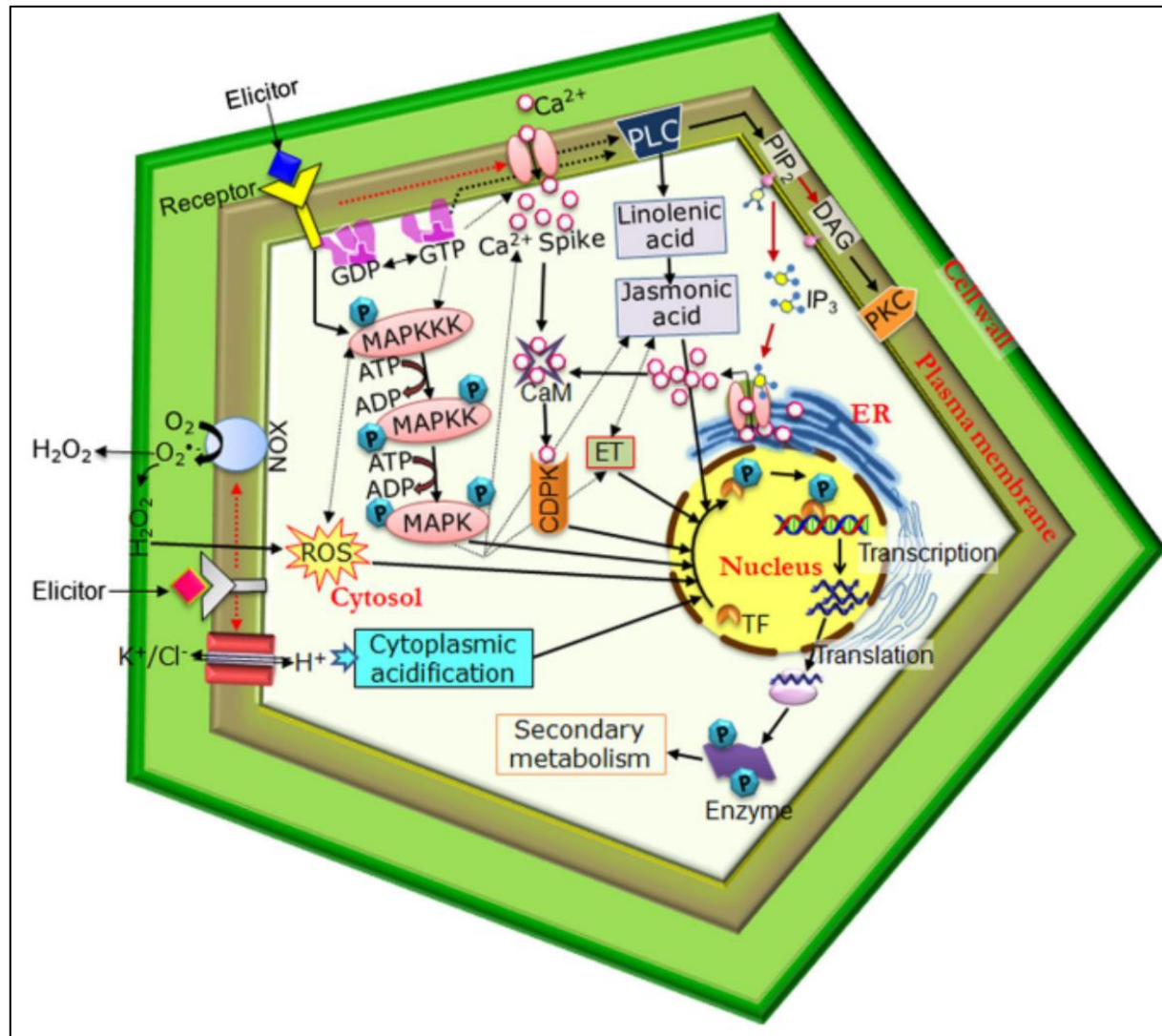


Figura 2. Mecanismo de señalización para la síntesis de metabolitos secundarios inducido por elicitores. El elicitor se une a su receptor y 1. activa proteínas G (GTP), que a su vez activa PLC. PLC hidroliza ácido linolénico que conlleva a la síntesis de ácido jasmónico. También hidroliza el PIP₂ produciendo IP₃ y DAG. DAG activa PKC que fosforila proteínas. IP₃ activa canales de calcio. El Ca²⁺ se une a CaM y activa CDPK; activa NADPH oxidasa produciendo H₂O₂ y EROS. 2. Se activan canales antiport H⁺/K⁺/Cl⁻ se acidifica el citoplasma. 3. Se activan proteínas MAPK, que originan producción de ácido jasmónico y etileno.

II. Antecedentes

Mamillaria candida pertenece al orden Caryophyllaceae y a la familia Cactaceae (Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2015). Es una cactácea pequeña, con tallo globoso-aplanado, las espinas radiales son largas, flexibles y numerosas (25 a 50), tiene de 4 a 12 espinas centrales divergentes, aciculares, rectas y rígidas; presenta flores umbiliformes de color blanco verdosas a blancas con un ligero tono rosa y por sus características, ha sido empleada como planta ornamental (Bravo-Hollis, 1978). Se encuentra distribuida en Nuevo León, Zacatecas, Tamaulipas, Coahuila, Guanajuato, San Luis Potosí y posiblemente en Durango (Hernández y Gómez-Hinostrosa, 2015). Esta cactácea, se encuentra en la Lista Roja de la UICN y está considerada amenazada (NOM-059-ECOL-2001).

Turbinicarpus laui Glass y Foster pertenece al orden Caryophyllaceae y a la familia Cactaceae (Hunt *et al.*, 2006). Consta de un tallo subgloboso-aplanado de color verde azulado, que mide de 35 mm de diámetro y 15 mm de altura; tiene espinas radiales rígidas, de 4 a 8 mm de longitud y centrales de 4 a 15 mm de longitud; presenta flores infundibuliformes, es decir en forma de embudo, de color blanco con tintes rosados (Martínez-Ávalos *et al.*, 2011). *T. laui* es una especie endémica de San Luis Potosí, distribuida en los municipios de Cerritos y Villa Juárez. Las poblaciones de *T. laui* se encuentran en decremento, por lo que es considerada una especie en peligro por la IUCN (2013) y amenazada de acuerdo con la NOM-059-ECOL-2001.

En trabajos previos se describió la obtención de callos y suspensiones de *M. candida* y *T. laui* que producían pigmentos del tipo de las betalainas (Mata-Rosas *et al.*, 2001; Santos-Díaz *et al.*, 2003). Posteriormente, se logró incrementar la producción de compuestos fenólicos, flavonoides y betalainas, así como, la actividad antioxidante por exposición polietilenglicol 1.25 %, sacarosa, luz UV y quitosano. Se observó que el quitosano fue el potenciador que indujo la mayor síntesis de metabolitos tanto en *M. candida* ($176 \pm 12 \mu\text{mol}$ de ácido gálico g^{-1} , $106 \pm 0.25 \mu\text{mol}$ quercetina g^{-1} , $1457 \pm 5.35 \mu\text{mol}$ Trolox 100g^{-1}) como en *T. laui* ($97.1 \pm 5.02 \mu\text{mol}$ ácido gálico g^{-1} ; $39.7 \pm$

1.02 μmol quercetina g^{-1} , 1457 ± 9.02 μmol Trolox 100 g^{-1}) (Reyes-Martínez *et al.*, 2019).

En los callos control e irradiados de *M. candida* se identificaron 20 compuestos, los cuales correspondieron a ácidos fenólicos y flavonoides, siendo los mayoritarios epicatequin dimetil galato, ácido bis-hidroxi-cinamoil-quínico, ácido diferuil quínico, apigenin xilósido glucósido, luteolín acetil glucósido y galoil rutinosa (Reyes-Martínez, 2019). En las suspensiones control y en las estimuladas con quitosano se identificaron 11 compuestos, que incluyeron dos derivados de neobetanina, epicatequin galato, digaloil ramnosa, ácido quínico, aconítico y un derivado de metil-(epi) galocatequina (Reyes-Martínez *et al.*, 2019).

Por otro lado, en las suspensiones de *T. laui* control y expuestas a quitosano se identificaron 16 compuestos, los cuales fueron derivados de ácidos fenólicos y flavonoides glucosilados. En presencia de quitosano, se incrementó la concentración de un derivado de ácido caféico, acatequin hexósido, ácido hidroxigálico y 17-descarboxi neobetanina (Reyes-Martínez *et al.*, 2019).

De los metabolitos identificados en *M. candida* y *T. laui*, los compuestos catequina, epigalocatequin galato y sus derivados, acetil glucósido de luteolina y derivados de galoil poseen actividad antioxidante, atribuido a la captación de radicales libres y disminución de la peroxidación de lípidos (Xie *et al.*, 2018). Particularmente, un derivado del ácido dicafeoil quínico, el ácido 1,5-O-dicafeoil-3-O-(metil éster del ácido 4-málico)-quínico, disminuyó los niveles de MDA y NOS (óxido nítrico sintasa) e incrementó los niveles de glutatión peroxidasa, en un ensayo *in vivo* en ratas inducidas con una lesión isquémica cerebral (Chen *et al.*, 2019).

También se ha reportado la actividad antiinflamatoria de catequina galato, epigalocatequina y sus derivados, a través de la inhibición de la producción de TNF α , IL-8 y NF κ B (Kürbitz *et al.*, 2011). De igual forma, el flavonoide luteolina se ha reportado como un potente antiinflamatorio, mediante estudios *in silico*, *in vitro*, *in vivo* y clínicos, los cuales sugieren que su principal mecanismo de acción es la regulación de factores

de transcripción como STAT3, NF- κ B y AP-1 (Aziz *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha reportado que el ácido quínico tiene efecto sobre la inflamación vascular al inhibir TNF- α y la señalización de NF κ B (Jang *et al.*, 2017).

Igualmente, se ha observado que el ácido-*trans*-aconítico posee actividad antiinflamatoria, mediante la disminución de la concentración de la enzima mieloperoxidasa (MPO) (Oliveira *et al.*, 2018) y actividad antioxidante (Piang-Siong *et al.*, 2017). Cabe mencionar que los flavonoides eriodictiol y diosmetina, identificados en suspensiones de *T. laui*, pese a que no fueron muy abundantes, poseen actividad antioxidante al inhibir la producción de MDA y regular las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Liao *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2019) y actividad antiinflamatoria al disminuir la concentración de las interleucinas IL-6, IL-4, IL-1 β (Jin Bai *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020).

Es importante mencionar que, en el estudio realizado por Lee *et al.*, (2020) se evaluó la actividad de la diosmetina mediante la inhibición de la MAP kinasa, activada con LPS por diferentes vías (ERK1/2, p38, JNK, NF- κ B p65 y STAT1) y la inhibición de TNF α , observando que el tratamiento con diosmetina disminuyó la expresión de NF κ B p65, STAT1 y TNF α .

En otro estudio se midió la actividad antioxidante mediante el ensayo de DPPH y la actividad vasodilatadora de los metabolitos presentes en los cultivos *in vitro* de *M. candida* de *T. laui*, en anillos de aorta de rata (Reyes-Martínez *et al.*, 2019, Reyes-Martínez *et al.*, 2021). El porcentaje de dilatación de los extractos de callos de *M. candida* irradiados con luz UV fue de 99 % a una concentración de 100 μ g mL⁻¹ y para la suspensión expuesta a quitosano fue de 85 % a una concentración de 50 μ g mL⁻¹. Para el caso de *T. laui*, el porcentaje de dilatación fue de 51.06 % con los extractos de suspensiones expuestos a quitosano y de 91.6 % con los callos irradiados, a una dosis de 25 μ g mL⁻¹ (Reyes-Martínez *et al.*, 2021). El Cuadro 1 resume algunos de los metabolitos identificados en *M. candida* y *T. laui* y los reportes como antioxidantes y antiinflamatorios.

Cuadro 1. Actividad antioxidante y antiinflamatoria de metabolitos identificados en callos y suspensiones estresados de *M. candida* y *T. laui*

Compuesto	Bioactividad/ Ensayo	Mecanismo	Dosis	Cita
Acacetina	1. Inducción con LPS en PMVECs 2. Línea celular endotelial de humano EA hy926	1. Incremento de HO-1 2. Inhibición de TNF α , IL-1 β . Incremento de HO-1	1. 50 mg kg ⁻¹ 2. 9 x10 ⁻⁴ mg mL ⁻¹	(Wu <i>et al.</i> , 2018; Wu <i>et al.</i> , 2020)
Ácido quínico	Antioxidante: ensayo HPMC (ensayo electroquímico) Línea celular de músculo liso vascular "MOVAS". Ensayo de adhesión de monocitos	Potencial antioxidante 4 % Inhibición de VCAM-1 Inhibición de MAPK y NF-k β	 1x10 ⁻⁴ -10x10 ⁻² mg mL ⁻¹	(Karaman <i>et al.</i> , 2019) (Jang <i>et al.</i> , 2017)
Ácido- <i>trans</i> -aconítico	Ensayo DPPH	Captador de radicales libres	1.22x10 ⁻² mg mL ⁻¹ (CI ₅₀)	(Piang-Siong <i>et al.</i> , 2017)
Ácido- <i>trans</i> -aconítico y derivados	Modelo de artritis aguda inducido con LPS	Disminución de MPO y CXCL1	0.003-3 mg mL ⁻¹	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
Apigenin-7-glucosido	DPPH, ensayo oxidación de proteínas, producción de ROS y SOD	Expresión de HO-1, producción de SOD	0.001, 0.09, 0.2 mg mL ⁻¹	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
Catequin galato	FRAP, DPPH, quelación de Fe ⁺² , ABTS Células PancTu-1 estimuladas con TNF α	 Inhibición de TNF α , NFk β , IL8	 0.035 mg mL ⁻¹	(Xie <i>et al.</i> , 2018) (Kürbitz <i>et al.</i> , 2011)
Diosmetina	Hemólisis de eritrocitos inducida con AAPH, ensayo de la actividad antioxidante celular Células raw 264.7 inducidas con LPS o IL-4	Disminución de MDA, regula SOD, CAT, GPx. Disminución de IL-6, IL-1 β , NO, iNOS, suprimió fosforilación de MAPK	0.1 mg mL ⁻¹ 0.06 mg mL ⁻¹	(Liao <i>et al.</i> , 2014) (Lee <i>et al.</i> , 2020)
Eridioctiol	Actividad de NADPH oxidasa, SOD, MDA, determinación de ROS intracelular Línea celular humana MCs	Incremento de SOD, disminución de MDA, inhibición de NADPH oxidasa Inhibición de TNF α , IL-1 β , IL-6	0.004 y 0.007 mg mL ⁻¹	(Jin Bai <i>et al.</i> , 2019)

III. Justificación e Hipótesis

3.1 Justificación

El incremento del desarrollo y muertes por las ECNT ha generado una emergencia sanitaria, por lo que se requiere buscar alternativas farmacológicas y no farmacológicas para aminorar este problema a la salud (OMS, 2022). Se ha descrito que la ingesta y/o tratamiento con agentes antioxidantes y antiinflamatorios exógenos mejora la sintomatología de las ECNT.

Las plantas, tales como las cactáceas, han sido empleados desde antaño en la medicina tradicional y representan una opción para la búsqueda de tratamientos con dichas características (Hernández *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2020). El uso indiscriminado de los recursos naturales puede llevar a un desabasto del material requerido para la obtención de los principios activos. El CTV es una herramienta que permite garantizar una dotación constante de plantas para obtener compuestos con actividad farmacológica, incluso en mayores concentraciones en comparación con la planta completa, (Santos-Díaz y Camarena-Rangel, 2019) sin dañar la población natural.

Dado que los extractos de cultivos *in vitro* de las cactáceas *M. candida* y *T. laui* sintetizan compuestos polifenólicos con actividad antioxidante *in vitro* (DPPH) (Reyes-Martínez *et al.*, 2019), constituyen una alternativa viable para estudiar sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que puedan coadyuvar a minorizar el problema actual a la salud previamente descrito. Es importante mencionar que para determinar el potencial antioxidante de una sustancia y/o extracto, es imprescindible realizar más de un ensayo (Hermans *et al.*, 2007). Por ello, para confirmar el reporte previo de la actividad antioxidante de los cultivos de *M. candida* y *T. laui*, en este proyecto se evaluaron otros dos ensayos de actividad antioxidante. Además de contribuir a un problema actual a la salud, se espera que este trabajo contribuya a incrementar el valor agregado de los cultivos *in vitro* de cactáceas.

3.2 Hipótesis

Los cultivos *in vitro* de las cactáceas *M. candida* y *T. laui* sintetizan metabolitos con importante actividad antioxidante y antiinflamatoria.

IV. Objetivos

4.1 General

Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de metabolitos producidos por cultivos *in vitro* de *M. candida* y *T. laui* para el aprovechamiento de cactáceas en la búsqueda de alternativas fitoterapéuticas para las ECNT.

4.2 Particulares

1. Inducir la síntesis de metabolitos en callos de *M. candida* y *T. laui* mediante radiación UV (estrés abiótico) y quitosano (estrés biótico).
2. Evaluar el rendimiento de la obtención de metabolitos en extractos de callos y suspensiones controles y estresados, de *M. candida* y *T. laui*.
3. Cuantificar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de *M. candida* y *T. laui* mediante el ensayo de FRAP.
4. Determinar la capacidad antioxidante *in vivo* de los extractos de *M. candida* y *T. laui* a través de la inhibición de la peroxidación lipídica (MDA), mediante el ensayo de TBARS.
5. Determinar la capacidad antiinflamatoria *in vitro* de los extractos en células polimorfonucleares de bazo de rata inducidas con LPS.
6. Determinar la capacidad antiinflamatoria *in vivo* de los extractos potenciales, en un modelo de inflamación aguda inducido por carragenina en la aponeurosis plantar posterior izquierda de rata.

V. Metodología

5.1 Producción de metabolitos en callos de *M. candida* y *T. laui*

Esta parte experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

5.1.1 Condiciones de cultivo de *M. candida* y *T. laui*

Los callos de *M. candida* y *T. laui* se obtuvieron del banco de germoplasma del Laboratorio de CTV. Para su cultivo se empleó el medio Murashige y Skoog, MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con sacarosa 30 g L⁻¹. Para solidificar el medio se añadieron 8.4 g L⁻¹ de agar. Los callos de *M. candida* se cultivaron en medio MS con 3 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a un pH final de 7.0. Los callos de *T. laui* se cultivaron en medio MS con 1 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) con un pH final de 7.5 (Reyes-Martínez, 2019). Los cultivos se incubaron a 25 °C en un cuarto de crecimiento, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Los callos se resembraron cada 30 días para su propagación.

5.1.2 Establecimiento de suspensiones celulares

Se colocaron aproximadamente entre 2 y 3 g de callo friable de *M. candida* y *T. laui* en 50 mL de medio líquido MS con 3 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de AIA, respectivamente. Para *M. candida* se mantuvo un pH final de 7.0 y para *T. laui* de 7.5. Las suspensiones se mantuvieron en agitación constante a 135 rpm en un agitador orbital y se realizaron resiembras cada 15 días (Reyes-Martínez, 2019).

5.1.3 Inducción del estrés biótico con quitosano

Para analizar el efecto del estrés biótico inducido con quitosano, se colocaron 5 gramos de suspensión celular en 50 mL de medio MS (n=16). Las suspensiones se cultivaron en oscuridad con agitación constante a 135 rpm durante 12 días.

Posteriormente, a cada matraz (n=8) se le adicionaron 1.25 mg mL⁻¹ y 2.5 mg mL⁻¹ de quitosano para *M. candida* y *T. laui*, respectivamente. Los matraces se mantuvieron en oscuridad con agitación constante por 24 h (Reyes-Martínez *et al.*, 2019). Una vez transcurrido el tiempo, las células se colectaron mediante filtración, empleando un papel filtro Whatman y se distribuyeron en tubos cónicos. La masa celular se liofilizó en un liofilizador Labconco, FreeZone 4.5, a -45 °C y 0.12 mBar de presión. Posteriormente, se almacenó a -20°C hasta su análisis.

5.1.4 Inducción del estrés abiótico con luz UV

Se colocó 1 gramo de callo friable en 20 frascos de cultivo y se mantuvo en la cámara de crecimiento durante 35 días. Una vez transcurrido el tiempo, los callos (n=10) se distribuyeron en cajas de Petri sin tapa y se irradiaron con una lámpara UV (modelo UVGL-551 UVP, 254 nm) a una distancia de 15.5 cm. Para *M. candida* el tiempo de irradiación fue de 4 h, mientras que para *T. laui* de 8 h ya que a estos tiempos cada especie presentó mayor producción de compuestos fenólicos (Reyes-Martínez, 2019). Los callos se colectaron en tubos cónicos, se liofilizaron y almacenaron a -20°C.

5.2 Extracción de compuestos fenólicos

Para la extracción de compuestos fenólicos, el liofilizado de callos y suspensiones se colocó en tubos cónicos de 50 mL y se adicionó etanol al 60 % (0.05 g ps mL⁻¹). Se homogenizó con ayuda de un vortex, se agitó a 25 rpm, en un agitador Unico Tube Rocker, durante 6 horas a temperatura ambiente, y se mantuvo en reposo toda la noche. El extracto hidroalcohólico se filtró, utilizando un papel filtro Whatman, posteriormente el etanol se eliminó en un horno a 40 °C y el agua restante se liofilizó (liofilizador Labconco, FreeZone 4.5) a -45 °C y 0.12 mBar de presión.

5.3 Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de *M. candida* y *T. laui*.

Esta parte experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Recursos Bióticos del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

5.3.1 Ensayo FRAP

Para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos de *M. candida* y *T. laui* se realizó el ensayo FRAP de acuerdo con el procedimiento propuesto por Benzie y Strain (1999), con adaptaciones para una microplaca de 96 pozos. Este ensayo se fundamenta en el poder reductor de una molécula al reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} del complejo TPTZ- Fe^{+3} (Benzie y Strain, 1999).

Los extractos hidroalcohólicos de ambas especies se evaluaron en concentración de 1 mg mL^{-1} y para los extractos más activos, la actividad antioxidante se determinó a través de una curva dosis-respuesta en escala logarítmica de 0.1, 1, 10 y $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. El reactivo FRAP se preparó mezclando buffer de acetato de sodio 300 mM (pH 3.6), tripiridil triazina (TPTZ, 10 mM; Sigma-Aldrich, T1253-1G) disuelto en HCl (40mM) y una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) en una proporción 10:1:1 (volumen). Como controles positivos se utilizaron vitamina E y ácido gálico en concentraciones de 1 mg mL^{-1} y $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Como estándar se utilizó Trolox (Sigma-Aldrich, 238813-1G) y como blanco el extracto sin reactivo de FRAP.

Para medir la capacidad reductora de los tratamientos, se tomó una alícuota de $20 \text{ } \mu\text{L}$ del extracto o control positivo, se mezclaron con $280 \text{ } \mu\text{L}$ del reactivo de FRAP y se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia en un lector de microplacas MultiSkan, utilizando un filtro de 595 nm. Se construyó una curva de calibración con una solución de Trolox en concentraciones de 0 a $0.14 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}$.

Las calculó el promedio de las absorbancias y se realizaron correcciones con el blanco de muestra y el blanco de FRAP, de la siguiente forma:

$$\text{Absorbancia corregida} = A - B - C$$

Donde A: absorbancia de la muestra; B: absorbancia del blanco de muestra; C: absorbancia del blanco de FRAP.

Finalmente se calculó la concentración de equivalentes Trolox (ET) con ayuda de la ecuación de la recta. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol ET g muestra}^{-1}$.

5.4 Determinación de la capacidad antioxidante *in vivo* de los extractos de *M. candida* y *T. laui* a través de la inhibición de la peroxidación lipídica (MDA).

Esta parte experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Recursos Bióticos del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

5.4.1 Ensayo de TBARS.

Se realizó la cuantificación de MDA *in vivo*, de acuerdo con las especificaciones del kit TBARS (Cayman). Se utilizó como material biológico el suero obtenido del ensayo 5.8 de inflamación aguda *in vivo* (estrés oxidativo inducido por carragenina).

De forma general, en un tubo cónico de 15 mL se mezclaron 100 μL de muestra o estándar con 100 μL de solución SDS (dodecil sulfato de sodio) y 4 mL del reactivo de color. En seguida, los tubos se taparon y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante una hora. Posteriormente, los tubos se retiraron y colocaron en un baño de hielo durante 10 minutos, para detener la reacción. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 2850 rpm a 4 °C. Después, se tomaron 150 μL del sobrenadante de cada tubo y se colocaron en la microplaca de 96 pozos, por triplicado. Se midió la absorbancia usando un filtro de 540 nm.

Se construyó una curva del estándar MDA en concentraciones de 0 a 50 μM . Se obtuvo el promedio de las absorbancias, realizando una corrección con el blanco de MDA (0 μM). Posteriormente, se calculó la concentración de MDA de los tratamientos, utilizando la ecuación de la recta.

5.5 Evaluación de la capacidad antiinflamatoria *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de las especies vegetales en células polimorfonucleares de rata *Wistar*

Esta parte experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Recursos Bióticos del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

5.5.1 Modelo *in vitro* de inflamación aguda

Se evaluó el efecto antiinflamatorio de los extractos hidroalcohólicos de los cultivos más activos derivados del ensayo antioxidante FRAP de *M. candida* y *T. laui*, mediante un modelo de inflamación aguda.

Se utilizaron como unidades experimentales ratas macho de la cepa *Wistar* de 250 g de peso corporal. Las ratas se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital (210 mg Kg^{-1}), por vía intraperitoneal (IP). Se realizó la disección del bazo, bajo condiciones estériles, en una campana de flujo laminar serie A2. Para llevar a cabo a disgregación celular, el bazo se maceró en 6 mL de medio RPMI-1640 (Gibco BRL) con ayuda de un strainer (45 μm , BD Falcon). La suspensión celular se centrifugó en tubos cónicos estériles (Corning) de 15 mL a 1500 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. Se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1.5 mL de solución de lisis estéril (EDTA, NH_2Cl y KHCO_3) durante 1 minuto para eliminar las células rojas. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante se eliminó por decantación. Para eliminar las células de rojas remanentes, se realizó un segundo lavado con medio RPMI-1640 y solución de lisis en proporción 2:1 (v/v). Esta suspensión se centrifugó nuevamente como se describió anteriormente. Finalmente, el sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de medio

RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 2 mM de L-glutamina y 1mM de aminoácidos no esenciales, con un pH de 7.

5.5.2 Determinación de la viabilidad celular

Una vez obtenida la suspensión celular (sc), se determinó la viabilidad celular usando azul de tripano el cual permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas). Para ello, se mezclaron 20 μl de sc con 970 μl de medio suplementado y 10 μl de azul de tripano al 0.4 %. Las células no teñidas se contaron en ocho cuadrantes en cámara de Neubauer y el número de células se ajustó para tener una concentración stock de 2×10^6 células mL^{-1} . Esta solución stock se usó para establecer los cultivos celulares (1×10^6 células mL^{-1} en cada pozo).

5.5.3 Inducción del modelo de inflamación aguda

Para esta parte experimental se utilizó como agente inductor de inflamación aguda el lipopolisacárido (LPS; Sigma-Aldrich) a una concentración de ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) y como agente antiinflamatorio el fármaco de referencia Indometacina a una concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$

Para evaluar la capacidad antiinflamatoria de los extractos vegetales se estableció como estrategia experimental los tratamientos que se describen en el cuadro 2. Se evaluaron los extractos de callo de *M. candida* (ECMC) y suspensiones de *M. candida* (ESMC) y *T. laui* (ESTL), control y estresados, disueltos en medio RPMI-1640 con DMSO 1 % en concentraciones de 0.1, 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Los cultivos celulares se establecieron en placas estériles de cultivo de fondo plano de 12 pozos (Costar). Primeramente, se adicionaron 500 μL del stock de células, para tener una concentración final de 1×10^6 células mL^{-1} . Los pozos del grupo de inflamación se estimularon con 1 μL de LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). A cada se pozo se le adicionaron 50 μL de cada tratamiento por triplicado de manera independiente. Finalmente, el volumen de los pozos se ajustó a 1 mL con medio RPMI-1640 suplementado y las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 %

durante 12 horas. Las células se despegaron de forma manual y, tanto las células como el medio de cultivo, se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se congeló a -20 °C para la posterior cuantificación de TNF α mediante el ensayo ELISA.

Cuadro 2. Diseño experimental de inflamación aguda *in vitro*.

Grupo control	Grupo de inflamación
Control de células	Células + LPS
Control DMSO 1 %	Indometacina 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + LPS
ECMC	ECMC + LPS
ESMC	ESMC + LPS
ESTL	ESTL
ECMC/UV	ECMC/UV + LPS
ESMC/quitosano	ESMC/quitosano + LPS
ESTL/quitosano	ESTL/quitosano + LPS

ECMC: extracto de callo de *M. candida*; **ESMC:** extracto de suspensión de *M. candida*; **ESTL:** extracto de suspensión de *T. laui*.

5.6 Evaluación de la capacidad antiinflamatoria *in vivo* de los extractos hidroalcohólicos de las especies vegetales en ratas macho de la cepa *Wistar*

5.6.1 Modelo *in vivo* de inflamación aguda

Se utilizaron 20 ratas macho adultas de la cepa *Wistar*, con un peso promedio de 250g. Los animales fueron adquiridos en el Centro de Biociencias de la UASLP y fueron tratados de acuerdo con Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Las ratas se distribuyeron de manera independiente y completamente al azar y se dejaron en

adaptación en la unidad de modelos animales del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas durante 5 días con libre acceso de agua y alimento en un cuarto con temperatura controlada de 22 ± 1 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas.

Se seleccionaron los extractos de callos estresados y suspensiones de *M. candida* (MU y MS, respectivamente). Los tratamientos se administraron vía i.p una hora antes de la inducción del edema, con el fin de favorecer la absorción del extracto y su efecto antiinflamatorio. Para inducir el edema de manera experimental se utilizó carragenina lambda IV (Fluka) al 1 %. La solución de carragenina se preparó al 1 % con solución salina al 0.9 %. Se administró un volumen de 0.2 mL de la solución de carragenina 1 % en la aponeurosis plantar izquierda (APPI) de la rata con aguja de insulina.

Se emplearon un total de 20 ratas (4 por grupo), distribuido de la siguiente manera:

- **Grupo 1**, *control negativo*: Solución salina fisiológica (SSF) 0.9 %.
- **Grupo 2**, *control de inflamación*: carragenina al 1 %.
- **Grupo 3**, *control antiinflamatorio*: indometacina en dosis de 0.1 mg Kg^{-1} + Carragenina al 1 %
- **Grupo 4**, *tratamiento 1*: MU + carragenina al 1 %.
- **Grupo 5**, *tratamiento 2*: MS + carragenina al 1 %.

Después de 4.5 horas (tiempo en el que se presenta el punto máximo de inflamación inducido por carragenina de acuerdo con Guzmán-Guzmán (2010), se tomaron muestras de sangre de la vena caudal de la rata (1 ml) por la técnica de goteo. Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos, para separar el suero. Se tomaron tres alícuotas de suero y se almacenaron a -20 °C.

Una vez tomadas las muestras sanguíneas, a las ratas control de inflamación se les administró vía i.p una dosis de indometacina (0.1 mg Kg^{-1}), para disminuir la inflamación.

5.6.2 Cuantificación de la secreción de TNF α

Se utilizó el kit de ELISA de TNF α (Lote 0414073, Peprotech). El experimento se desarrolló siguiendo las indicaciones del inserto del kit. En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 100 μ L del anticuerpo primario o de captura purificado (1 μ g mL⁻¹ en PBS 1X) y se incubó a temperatura ambiente durante la noche. Al finalizar este tiempo, la placa se lavó cuatro veces con el buffer de lavado (PBS 1X/ 0.05 % Tween 20; BL). Después se adicionaron 300 μ L de solución bloqueadora (PBS 1X/ 10 % suero fetal bovino, SFB Gibco BRL) y la placa se incubó a temperatura ambiente durante una hora.

Una vez transcurrido el tiempo, la placa se lavó con BL, se adicionaron a cada pozo 100 μ L de la muestra o estándar por triplicado y de manera independiente, y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con BL, a cada pozo se agregaron 100 μ L de anticuerpo secundario o de detección (0.50 μ g mL⁻¹) disuelto en la solución diluyente (PBS 1X/ 0.05 % tween 20/ 1 % SFB; SD) y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. La placa se lavó con el BL y se adicionaron 100 μ L del conjugado de avidina-HRP (1:2000 en SD), se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

La placa se lavó con BL, posteriormente se agregaron 100 μ L de ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6 ácido sulfónico) / H₂O₂ 30 % a cada pozo. Después de 30 minutos de reacción, se determinó la densidad óptica mediante el lector de microplacas para ELISA (Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 405 nm. Se construyó una curva de calibración con el estándar TNF α en concentraciones de 0-3000 Pg mL⁻¹. Los resultados se compararon con la curva de TNF α , y con base en la ecuación de la recta, se calculó la concentración de citocina presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares y sueros.

5.7 Análisis estadístico

Se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y homocedasticidad de Levene. Para los casos de cumplimiento de normalidad y homogeneidad de varianza, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANADEVA) seguida de una prueba Post Hoc de Tukey para determinar si existen diferencias significativas. Para los casos donde no se cumplió normalidad, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba Post Hoc de Dunn. Se consideró como valor de significancia una $p < 0.05$. Se empleó el software R versión 3.4.4 (R Core Team, 2014).

VI. Resultados y discusión

6.1. Propagación de callos y suspensiones de *M. candida* y *T. laui*

Los callos de *M. candida* y *T. laui* se propagaron para tener material suficiente para los experimentos. Se inició con 10 frascos para cada especie lográndose obtener 45 frascos en un periodo 30 semanas (Figura 3a, b). Los callos de *M. candida*, tuvieron un aspecto friable lo cual era esencial para obtener suspensiones celulares finas. En el caso de los callos de *T. laui* se obtuvieron callos compactos. Después de seis resiembras, una vez que se incrementó el pH final a 7.5, los callos tomaron un aspecto friable (Figura 3c). En la obtención de un callo friable intervienen distintos factores como la fuente de carbono, los reguladores de crecimiento y el pH (Jayaraman *et al.*, 2014). Por esto, al modificar el pH, se obtuvo un callo friable.



Figura 3. Aspecto de callos de *M. candida* y *T. laui* a) callo friable de *M. candida*, b) callo compacto de *T. laui*. c) callo friable de *T. laui*.

Los callos de *M. candida* se colocaron en medio líquido y se obtuvieron suspensiones finas después de dos resiembras. Las suspensiones presentaron tonalidad roja y rápido crecimiento (Figura 4a).

En cuanto a *T. laui*, las suspensiones iniciales presentaron agregados celulares (Figura 4b), ya que los callos no eran muy friables. Una vez obtenido un callo friable de *T. laui*,

las suspensiones presentaron células disgregadas y después de 3 resiembras se obtuvieron suspensiones finas con una tonalidad roja (Figura 4c). Para la obtención de una suspensión fina se requiere un callo friable ya que un callo compacto no favorece la división celular (Ifeoma y Eneobong, 2008)).

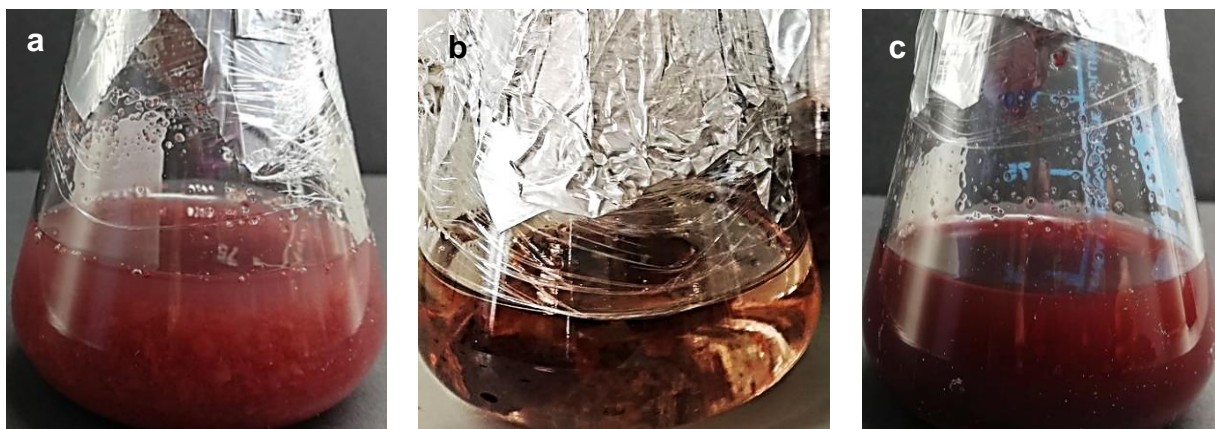


Figura 4. Suspensiones de *M. candida* y *T. laui*. a) Aspecto de suspensiones finas de *M. candida*, b) Agregados celulares de *T. laui* en medio líquido, c) Suspensiones finas de *T. laui*.

6.2 Inducción y rendimiento de los metabolitos secundarios en callos de *M. candida* y *T. laui* mediante estrés biótico (quitosano) y abiótico (radiación UV)

6.2.1 Inducción de estrés biótico y abiótico

Con el fin de incrementar la producción de antioxidantes, los callos de *M. candida* (n=5) y *T. laui* (n=7) se irradiaron con luz UV. Después de la irradiación presentaron un aspecto menos hidratado debido a la deshidratación causada por la corriente de aire de la campana de flujo laminar (Figura 5 a, d). De los callos de *M. candida* y *T. laui* irradiados se obtuvo un peso fresco de 19.22 g y 37.41 g, respectivamente. El peso fresco de los callos control (sin irradiar) de *M. candida* fue 14.95 g y de *T. laui* 23.94 g (Cuadro 3).

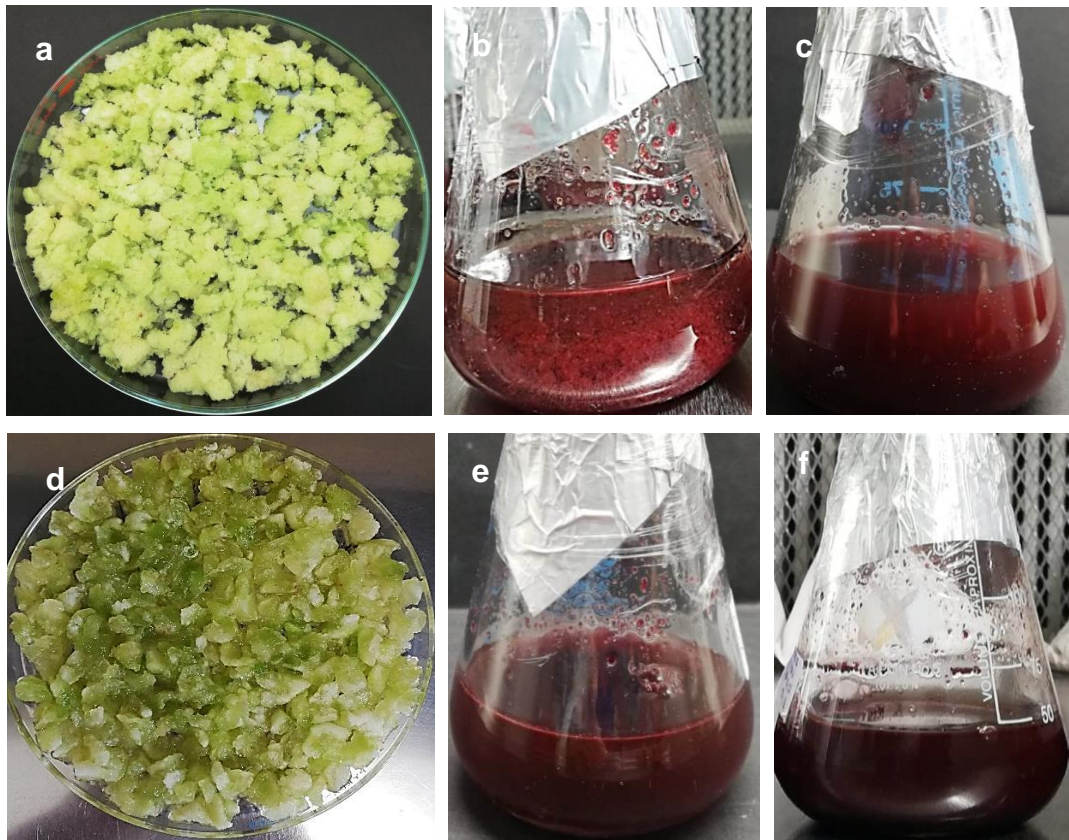


Figura 5. Estrés biótico y abiótico en callos y suspensiones de *M. candida* y *T. laui*. a) aspecto de callo de *M.candida* expuesto a radiación UV 4 h. b) suspensión control de *M. candida*, c) suspensión de *M. candida* expuesta a quitosano (1.25 mg mL^{-1}) por 24 h, d) aspecto de callo de *T. laui* expuesto a radiación UV 8 h, e) suspensión control de *T. laui*, f) suspensión de *T. laui* expuesta a quitosano (2.5 mg mL^{-1}) por 24 h.

En ambos tipos de cultivo (callo y suspensiones), se obtuvo un mayor peso fresco en los cultivos estresados, ya que el uso de elicitores es una estrategia para incrementar el crecimiento celular y el contenido de metabolitos secundarios (Mathew y Deepa Sankar, 2014). Una vez liofilizado el material fresco de callos y suspensiones, se obtuvo una reducción del peso de entre 13 y 24 veces (Cuadro 3).

Cuadro 3. Peso fresco y seco, peso de extracto y porcentaje de rendimiento de extracción de cultivos *in vitro* de *M. candida* y *T. laui*

Especie	Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>M. candida</i>	Suspensión	66	4.77	1.39	29.17
<i>M. candida</i>	Quitosano	52.84	2.92	1.10	37.63
<i>M. candida</i>	Callo	14.95	1.81	0.96	53.02
<i>M. candida</i>	UV	19.22	2.62	1.28	49.07
<i>T. laui</i>	Callo	23.94	4.25	2.05	48.19
<i>T. laui</i>	UV	37.41	5.03	2.87	57.09
<i>T. laui</i>	Suspensión	15.24	0.98	0.25	22.5
<i>T. laui</i>	Quitosano	15.96	1.12	0.40	40.5

6.2.2 Extracción de compuestos fenólicos

Los extractos de las suspensiones presentaron un color rojizo, mientras que el de los callos una tonalidad entre verde y amarillo (Figura 6). El rendimiento de las extracciones fue alrededor de 22 - 57 % (Cuadro 3). El rendimiento de una extracción aporta información sobre los metabolitos que se obtuvieron de un material vegetal. Se destaca que el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos en los callos controles e irradiados fue mayor al de las suspensiones control y estresadas.



Figura 6. Filtración y apariencia de los extractos hidroalcohólicos de suspensiones y callos, control y estresados, de *M. candida* y *T. laui*.

6.3 Evaluación de la actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP

En el ensayo FRAP se evalúa la capacidad del antioxidante para ceder un electrón en la reacción, reduciendo el ion férrico (Fe^{+3}) del complejo $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$ al ion ferroso (Fe^{2+}), generando un color morado intenso (Benzie y Strain, 1999). La curva estándar de Trolox presentó un comportamiento lineal con una r^2 de 0.9914 (Figura 7a), observándose el aumento del color morado en las placas al incrementar la concentración del estándar Trolox (Figura 7b).

Los extractos de *M. candida* presentaron mayor actividad antioxidante (AO) que los extractos de *T.lauri* y para ambas especies, los extractos de las suspensiones mostraron mayor actividad AO que los callos (Figura 8). El extracto de las suspensiones control (sin estímulo) de *M. candida* (MS) presentó la mayor actividad AO ($97.79 \pm 3.63 \mu\text{mol ET g de muestra}^{-1}$) seguido del extracto de las suspensiones estresadas con quitosano (MQ; $72.51 \pm 0.27 \mu\text{mol ET g de muestra}^{-1}$). Se observó que la actividad AO de MS fue 1.2 veces mayor que la vitamina E y 1.5 veces menor que el ácido gálico ($p < 0.05$). Por otro lado, la actividad AO de MQ no tuvo diferencia significativa con la vitamina E ($p > 0.05$). En cuanto a los extractos de los callos de *M. candida*, no se observó diferencia significativa en la actividad AO ($p > 0.05$) entre los callos control e irradiados.

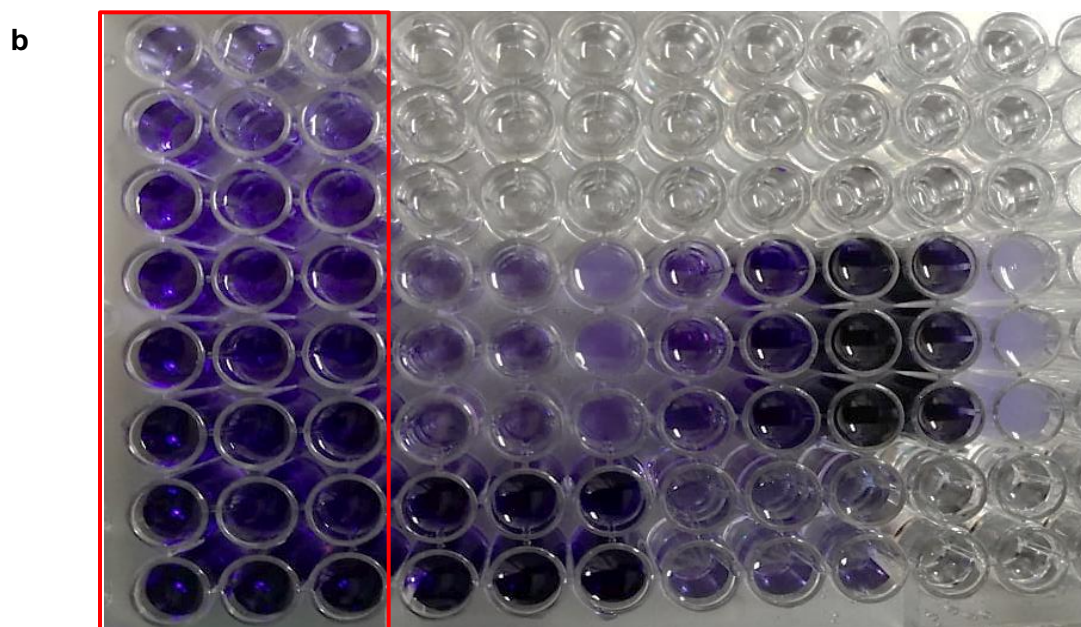
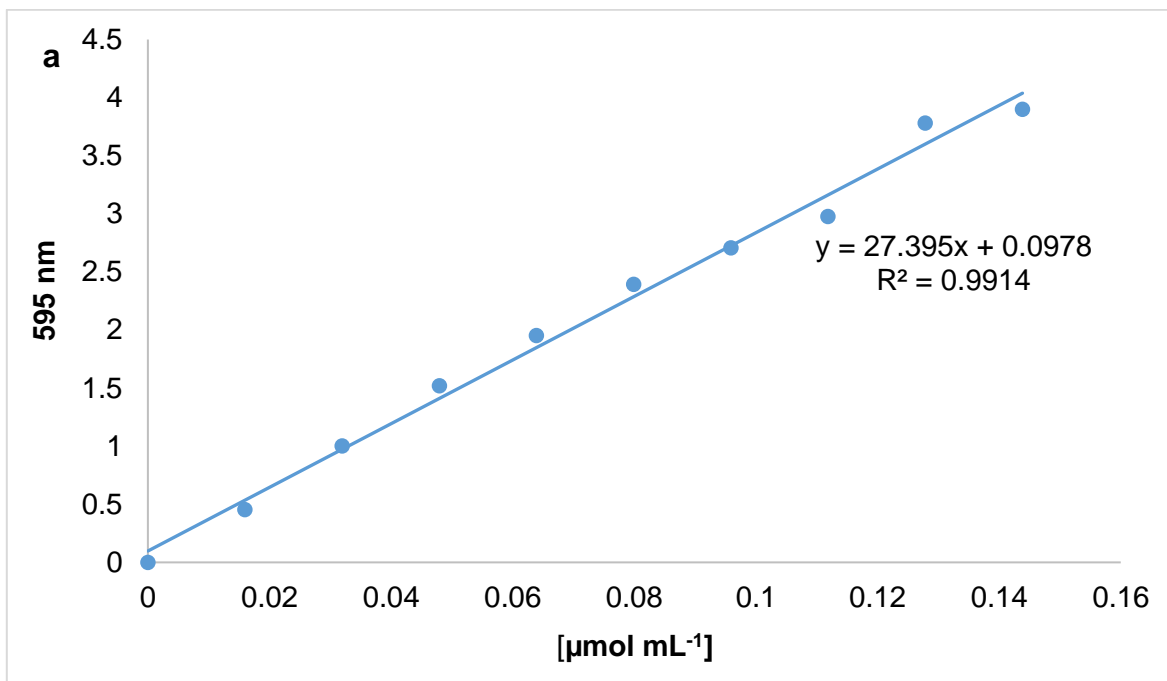


Figura 7. Ensayo FRAP. a) Curva de calibración con el estándar Trolox. b) aspecto de la microplaca con la curva Trolox y los tratamientos, se observa el incremento del color morado al aumentar la concentración del Trolox (cuadro rojo).

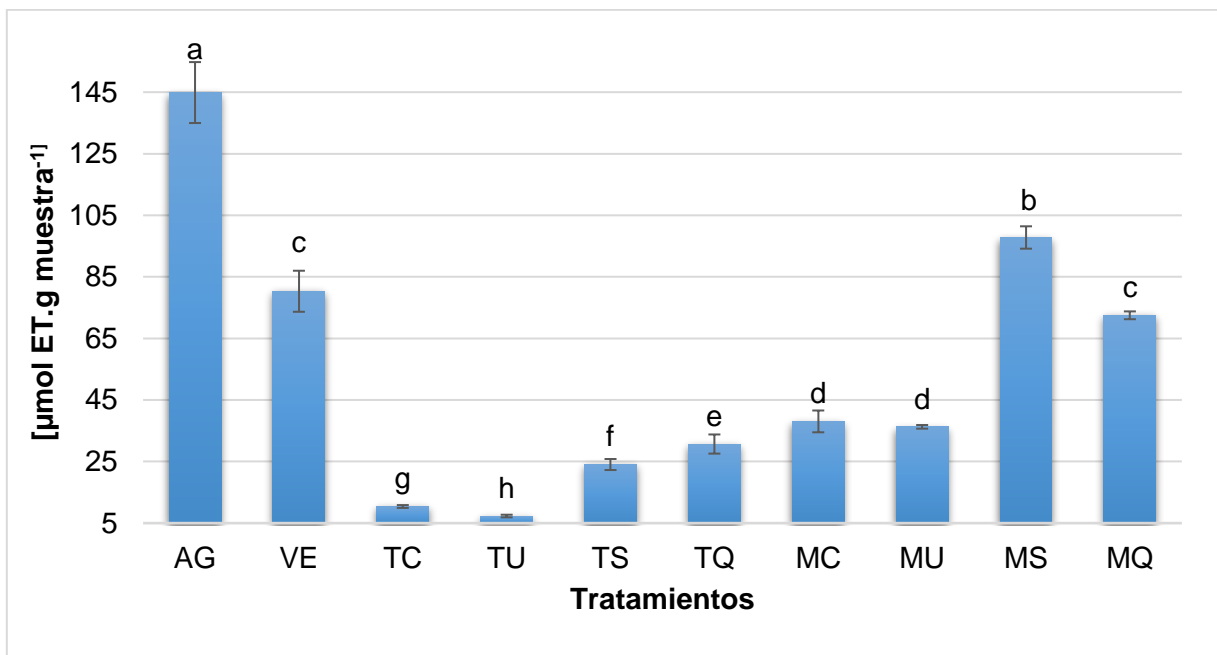


Figura 8. Actividad antioxidante (FRAP) de los extractos de los cultivos de *T. laui* y *M. candida*. Las barras representan el promedio \pm DE (n = 3) de los tratamientos. Las letras indican diferencia significativa entre los tratamientos (p < 0.05). Prueba Kruskal-Wallis y Post Hoc de Dunn. AG: ácido gálico; VE: vitamina E; TC: *T. laui*, extracto de callo control; TU: *T. laui*, extracto de callo irradiado; TS: *T. laui*, extracto de suspensión control; TQ: *T. laui*, extracto de suspensión con estrés; MC: *M. candida*, extracto de callo control; MU: *M. candida*, extracto de callo irradiado; MS: *M. candida*, extracto de suspensión control; MQ: *M. candida*, extracto de suspensión con estrés.

Reyes-Martínez *et al.*, (2019) evaluaron la actividad antioxidante de los cultivos de *M. candida* y *T. laui* por el método de DPPH, observando mayor actividad AO en los cultivos de *M. candida*. Encontraron que la actividad AO en callos irradiados fue mayor que en el control y que en el extracto de la suspensión de *M. candida* expuesta a quitosano. Estas diferencias podrían ser atribuidas al mecanismo de acción de los antioxidantes. En el ensayo FRAP el mecanismo de reacción de un antioxidante se enfoca en la transferencia de un electrón (TE) al oxidante, mientras que en el ensayo por DPPH se basa en la capacidad del antioxidante para estabilizar un radical, ya sea por la transferencia de un electrón (TE) o de un átomo de hidrógeno (TAH) (Shahidi y Zhong, 2015).

La importante AO de los extractos podría atribuirse a los diferentes compuestos presentes en los extractos tales como epicatequin dimetil galato, catequin galato, derivado de digaloil glucósido y galoil rutinosa presentes en los callos y suspensiones de *M. candida* y al contenido de ácido hidroxigálico presente en las suspensiones de *T. laui*.

El ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), es uno de los antioxidantes más potentes que además tiene actividad anticancerígena y antiinflamatoria (Jinrong Bai *et al.*, 2021). Velderrain-Rodríguez *et al.*, (2018), reportaron que el ácido gálico presentó mayor actividad antioxidante FRAP ($320 \pm 0.024 \mu\text{mol ET mol de antioxidante}^{-1}$) en comparación con otros polifenoles como la quercetina, rutina, ácido elágico y ácido ferúlico, o extractos de polifenoles de la cáscara de mango ataulfo. Se ha descrito que el AG tiene como mecanismo de reacción antioxidante la transferencia de un electrón (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2018).

Posteriormente, se realizó una curva dosis-respuesta con la finalidad de conocer que la concentración del extracto presentaba mayor actividad AO (Figura 9). Se observó que concentraciones menores a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ no presentaron AO o fue muy pequeña en todos los extractos. A valores mayores de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ se incrementó rápidamente la AO, principalmente con los extractos de MS y MQ (Figura 9).

6.4 Actividad antiinflamatoria *in vitro*

El Factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) es una de las citocinas proinflamatorias más importantes, pues participa en la vasodilatación, formación del edema, expresión de moléculas de adhesión, además contribuye a la síntesis de otras citocinas proinflamatorias, como IL-6 (Zelová y Hošek, 2013; Kallioliás y Ivashkiv, 2016) y por ello, es uno de los marcadores de inflamación más utilizados.

Antes de iniciar la determinación del $\text{TNF}\alpha$ se realizó una curva de calibración obteniéndose un R^2 de 0.9953 (Figura 10).

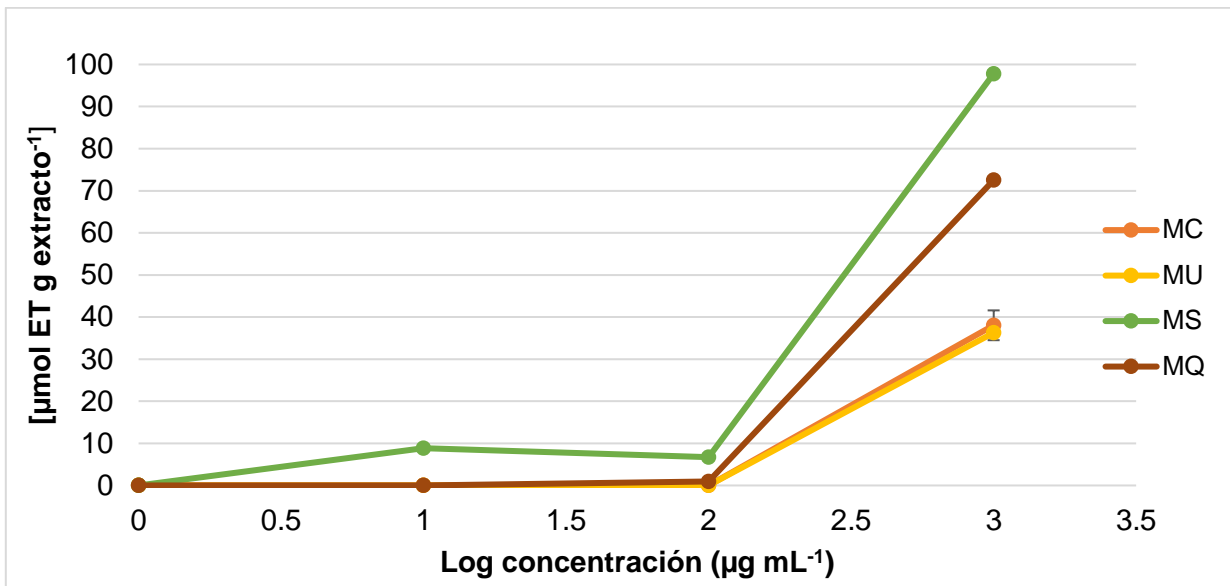


Figura 9. Curva dosis-respuesta de extractos más activos de cultivos de *M.candida*.

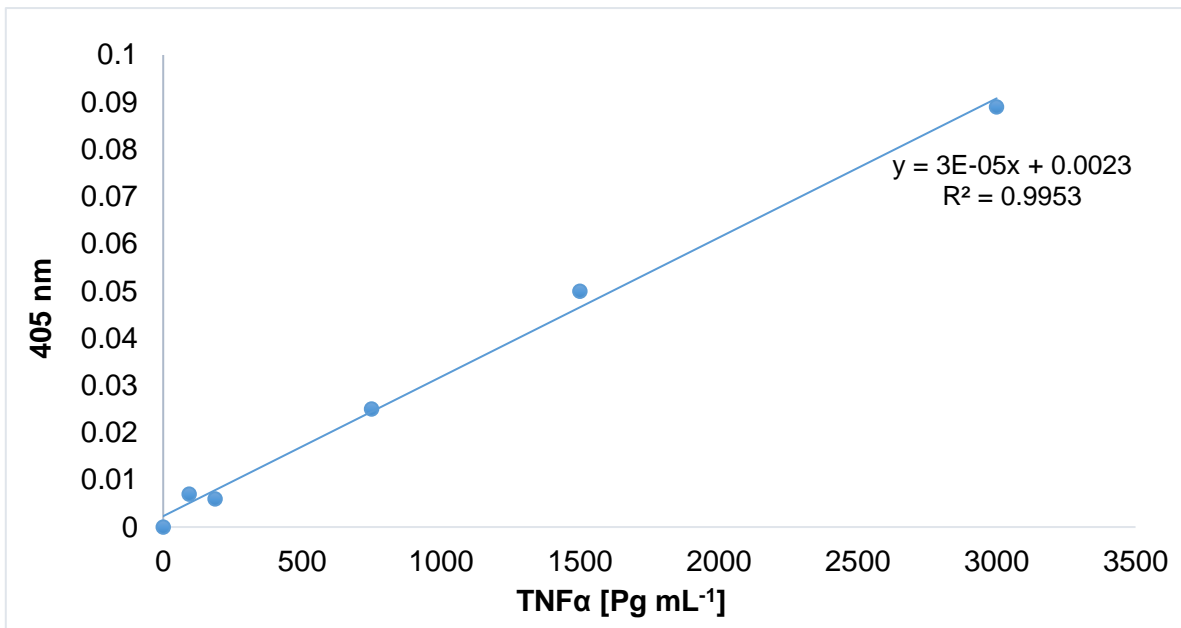


Figura 10. Curva de calibración TNFα.

El LPS usado como inductor se une al receptor tipo toll 4 (TLR4) de los macrófagos, activando el $\text{NF}\kappa\beta$ y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), induciendo la síntesis de citocinas proinflamatorias, como $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL-1 (Cao *et al.*, 2019). Después de la inducción con LPS en concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 12 h, se incrementó la concentración de $\text{TNF}\alpha$ un 33 % con relación al control (CC). Los resultados obtenidos fueron semejantes a lo reportado por Lee *et al.*, (2020), donde el LPS incrementó aproximadamente un 50 % la concentración de $\text{TNF}\alpha$ en macrófagos RAW264.7, en comparación con el grupo control.

Es importante destacar que la concentración de LPS, el tiempo de estímulo, así como el tipo de macrófagos empleados influyen en la concentración de $\text{TNF}\alpha$. En este trabajo se observó que el incremento de $\text{TNF}\alpha$ varía con el tiempo, ya que a las 12 h incrementó la concentración de $\text{TNF}\alpha$, pero a las 24 h no se observó este incremento (datos no mostrados). Dicho efecto también fue descrito en macrófagos peritoneales de ratón por Arteaga-Figueroa (2018). En otros estudios de inflamación, con macrófagos RAW264.7 las dosis de LPS variaron entre $1-100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ con 24 h de estímulo (Wu *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020).

El ensayo en presencia de los extractos mostró diferencias significativas en la actividad antiinflamatoria entre ellos ($p < 0.05$; Figura 11). El extracto MU presentó la mayor actividad antiinflamatoria, y a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ disminuyó 92 % la concentración de $\text{TNF}\alpha$, comparada con el grupo de inflamación ($p < 0.05$). Siguió en actividad antiinflamatoria los extractos MS, TS y TQ, que disminuyeron 53 % la concentración de $\text{TNF}\alpha$. La actividad antiinflamatoria de los extractos MS, TS y TQ no fue estadísticamente diferente de la indometacina ($p > 0.05$), mientras que la de los extractos MC y MQ fue igual al control de células ($p > 0.05$; Figura 11).

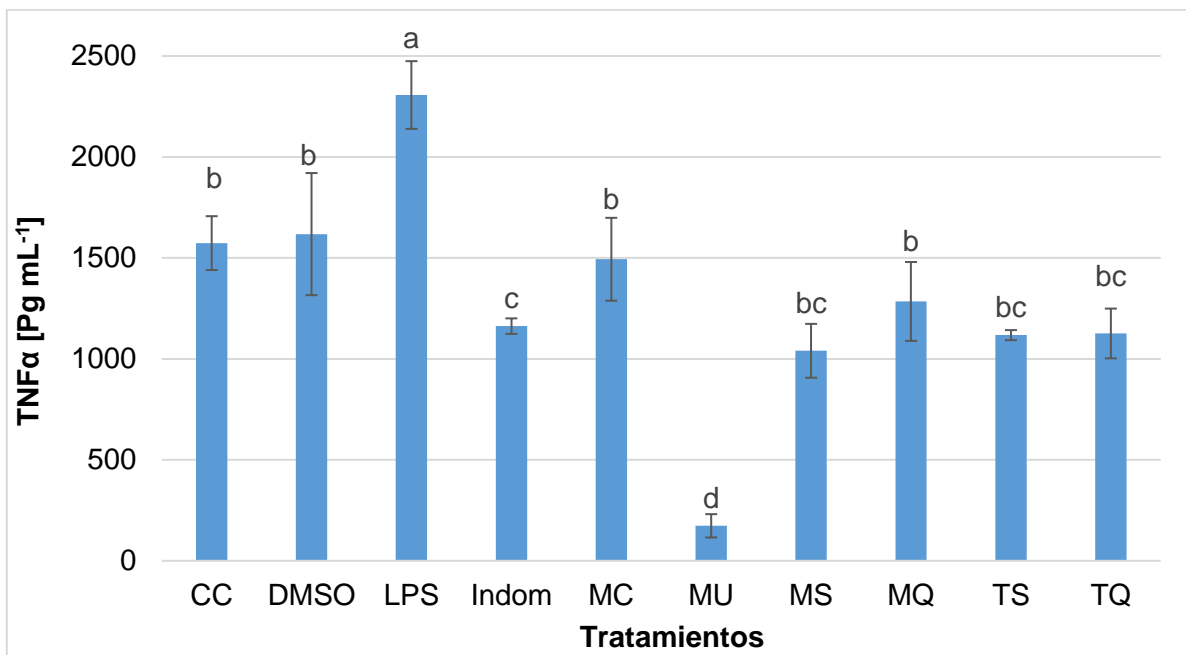


Figura 11. Actividad antiinflamatoria *in vitro* de extractos de cultivos de callos y suspensiones de *M. candida* y *T. laui* (1000 µg mL⁻¹) en células PMN de bazo de rata estimuladas con LPS (1 µg mL⁻¹, 12 h). Las barras representan el promedio ± DE (n=3). Las letras indican diferencia significativa entre los tratamientos (p < 0.05, Prueba Tukey). MC, MU: extracto de callos control e irradiados de *M. candida*; MS, MQ: extractos de suspensiones control y estresadas de *M. candida*; TS, TQ: extractos de suspensiones control y estresadas de *T. laui*; CC: control de células.

Con relación a la curva dosis respuesta, no se observó una disminución de la concentración de TNFα en función de la concentración (Figura 12). Los extractos TQ y MQ, y TS y MS presentaron el mismo efecto antiinflamatorio a diferentes concentraciones (Figura 12), sugiriendo que podrían tener un mecanismo de acción similar. Estos resultados podrían estar relacionados con el mecanismo de acción ejercido por cada metabolito presente en el extracto, pudiendo ser selectivos para algunos receptores y/o enzimas. Por ejemplo, algunos extractos de plantas, como *Solanum lycopersicum*, *Allium sativum* y *Ocimum basilicum*, o metabolitos como quercetina, ácido ferúlico y alicina; que pueden actuar inhibiendo a las enzimas COX-2 y LOX-5, o activando las MAPK (Azab *et al.*, 2016).

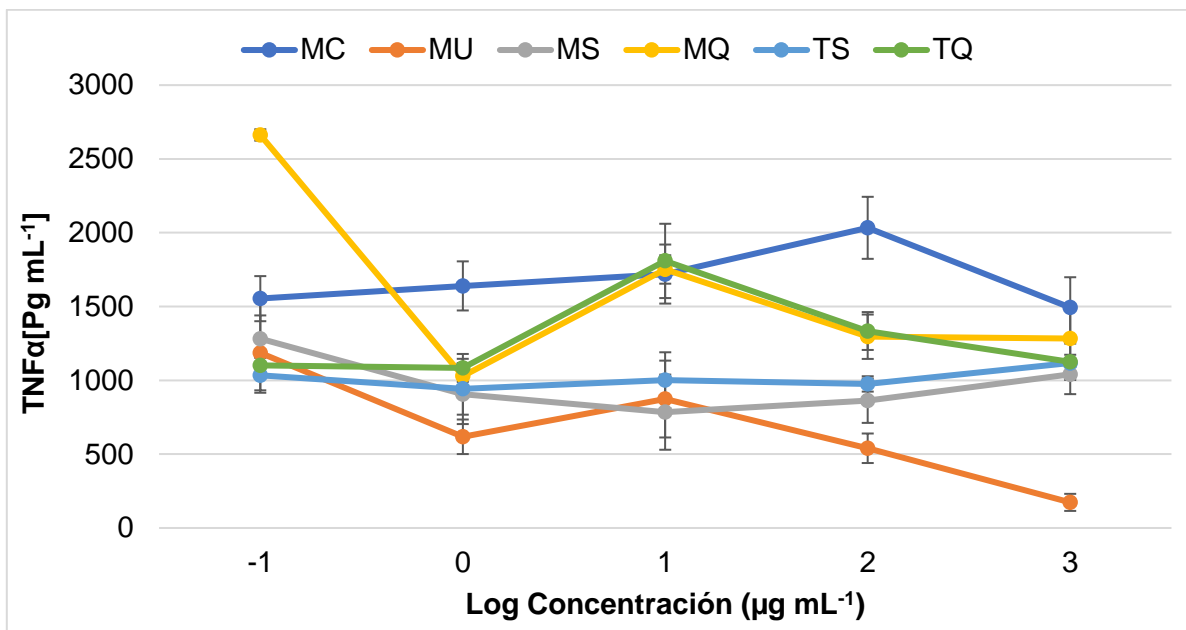


Figura 12. Curva dosis-respuesta en la concentración de TNF α secretada por las células PMN de bazo de rata (estimadas con LPS, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) tratadas con los extractos de cultivo de callos y suspensiones de *M. candida* y *T. laui*.

Particularmente, en los extractos de los cultivos de *M. candida* y *T. laui* se han identificado metabolitos como la diosmetina, el ácido *trans*-aconítico, el ácido quínico y la luteolina (Reyes-Martínez *et al.*, 2019). Estos compuestos tienen actividad antiinflamatoria *in vitro* al inhibir la liberación de la quimioquina CLX-1 y la fosforilación de las MAPK, o modificar las vías de señalización de factores de transcripción como NF κ B, STAT-3 y AP-1, que participan en la señalización de TNF α (Jang *et al.*, 2017; Aziz *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2020).

Con el fin de evaluar si los extractos de los cultivos *in vitro* no tenían un efecto tóxico sobre los macrófagos, éstos se expusieron a diferentes concentraciones de los extractos MC, MU, MS, MQ, TS, TQ (Figura 13). Se observó que los extractos MU, MQ y TS, en todas las concentraciones evaluadas, disminuyeron desde un 25 hasta un 75 % la concentración de TNF α , mientras que los extractos MC (10-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), MS (0.1 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y TQ (0.1-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), disminuyeron la concentración de TNF α de manera similar al control de células (CC). Los resultados obtenidos muestran que los

metabolitos presentes en el extracto, en condiciones normales, tienen un efecto antiinflamatorio y no muestran efecto tóxico sobre las células.

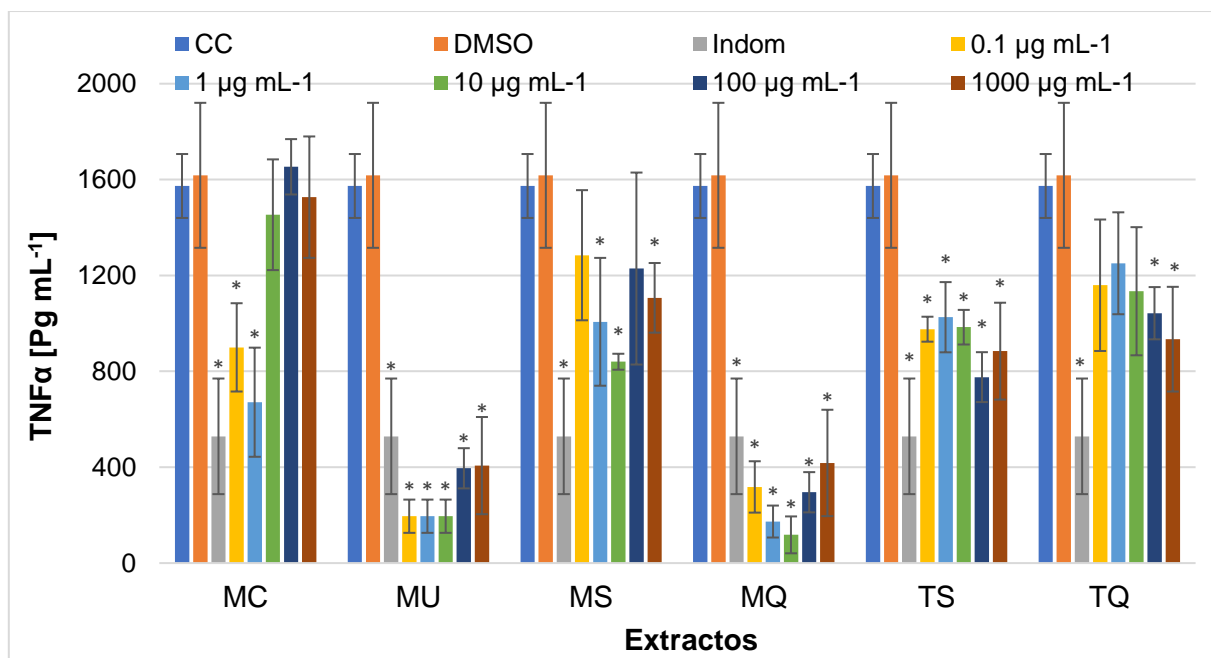


Figura 13. Concentración de TNF α secretada por las células PMN de bazo de rata (sin estímulo de inflamación) tratadas con los extractos de cultivo de callos y suspensiones de *M. candida* y *T. laui*. Las barras representan el promedio \pm DE (n=3). El asterisco (*) representa diferencia significativa de los tratamientos comparados con el control de células (CC) ($p < 0.05$). ANADEVa con prueba Post Hoc de Tukey.

6.5 Actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vivo*

La técnica de edema en pata de rata inducido por carragenina es un modelo de inflamación aguda ampliamente usado para la búsqueda de nuevas moléculas antiinflamatorias, ya que la estimulación *in vivo* con carragenina induce una potente respuesta en la liberación de macrófagos (Di Rosa *et al.*, 1971; Pereira Nacife *et al.*, 2004). La inducción del edema se divide en dos fases, la primera (fase temprana) ocurre en la primera hora, donde se libera histamina, serotonina, bradiquininas y una menor de prostaglandinas. En la segunda hora (fase tardía) se infiltran leucocitos

polimorfonucleares, como macrófagos y se liberan más prostaglandinas (Pereira Nacife *et al.*, 2004; Sadeghi *et al.*, 2011).

La carragenina, se une a los receptores TLR4 de los leucocitos polimorfonucleares, originando la activación de NFκβ y con ello la liberación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, óxido nítrico y citocinas proinflamatorias como TNFα e IL-1β (Sadeghi *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2020). Por lo anterior, la carragenina es un buen inductor tanto de inflamación como de daño oxidativo. En este proyecto se seleccionó el ensayo TBARS para cuantificar la liberación de malondialdehído (MDA) causado por la exposición a carragenina. El MDA es un producto de la peroxidación lipídica ocasionado por el daño de los radicales libres a los lípidos de la membrana, por lo que es un indicador de estrés oxidativo a las células (Zhang *et al.*, 2020). Antes de realizar el ensayo se realizó la curva de calibración de MDA (Figura 14) observándose una buena linealidad (R^2 0.9943).

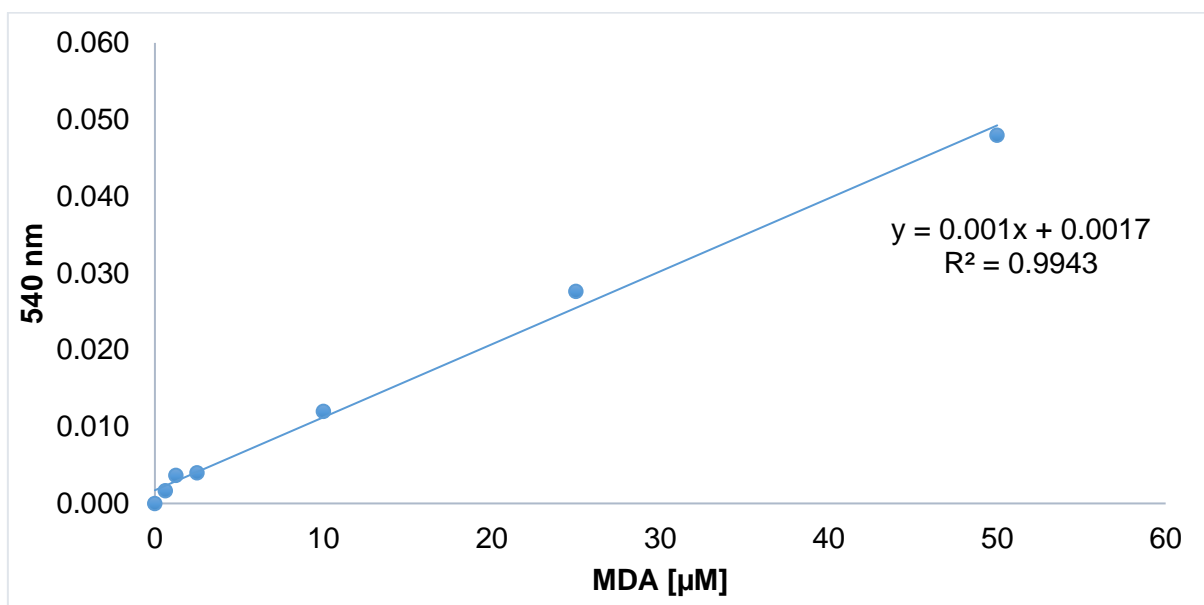


Figura 14. Curva de calibración de malondialdehído (MDA) para ensayo TBARS.

La concentración de MDA en el suero de rata en un estado basal fue de 10.78 ± 0.64 μ M de MDA, y se incrementó 1.41 veces en presencia de carragenina 1 % (Figura 15).

Lo anterior indica que la carragenina ejerció un daño oxidativo en las células y desarrolló un proceso inflamatorio. Esto coincide con lo reportado por otros autores que utilizan el mismo modelo para inducir inflamación y daño oxidativo en la célula de la rata (Azab *et al.*, 2016).

Por otro lado, la concentración de MDA disminuyó a $13.28 \pm 0.56 \mu\text{M}$ (13 % con relación a la carragenina) en presencia de la indometacina a una dosis de 0.1 mg Kg^{-1} . En cuanto al efecto de los extractos, se observó que los dos extractos evaluados, a una dosis de 0.6 mg Kg^{-1} , disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) la concentración de MDA en el ensayo *in vivo* (Figura 15).

El extracto MU disminuyó un 22 % la concentración de MDA comparado con el suero de rata con carragenina (CI) y la respuesta fue 10 % mejor que con la indometacina. La inhibición de la peroxidación lipídica observada con el extracto MS no fue estadísticamente diferente ($p > 0.05$) a la indometacina (Figura 15). Lo anterior indica que los extractos MU y MS poseen compuestos con importante acción antioxidante, aún después de su proceso de biotransformación en los tejidos.

Para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo*, se usó como inductor de la inflamación la carragenina y como control positivo la indometacina. Este compuesto es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), que inhibe la síntesis de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y en consecuencia disminuye la producción de la prostaglandina 2 (PGE_2) (Palomer, 2013). Los datos mostraron que la carragenina incrementó 3.25 veces la concentración de $\text{TNF}\alpha$, en relación con el suero en estado basal (Figura 16). Esto coincide con lo reportado por otros autores que utilizan el mismo modelo para inducir inflamación en la célula de la rata (Azab *et al.*, 2016).

En cuanto a la indometacina, en concentración de 0.1 mg Kg^{-1} , disminuyó un 18 % la concentración de $\text{TNF}\alpha$ (Figura 16). Los extractos MS y MU (0.6 mg Kg^{-1}) disminuyeron entre 28 y 46 % la concentración de $\text{TNF}\alpha$, no habiendo diferencia significativa entre ellos ($p > 0.05$). La actividad antiinflamatoria de los extractos MU y MS fue 1.35 veces mayor que la indometacina.

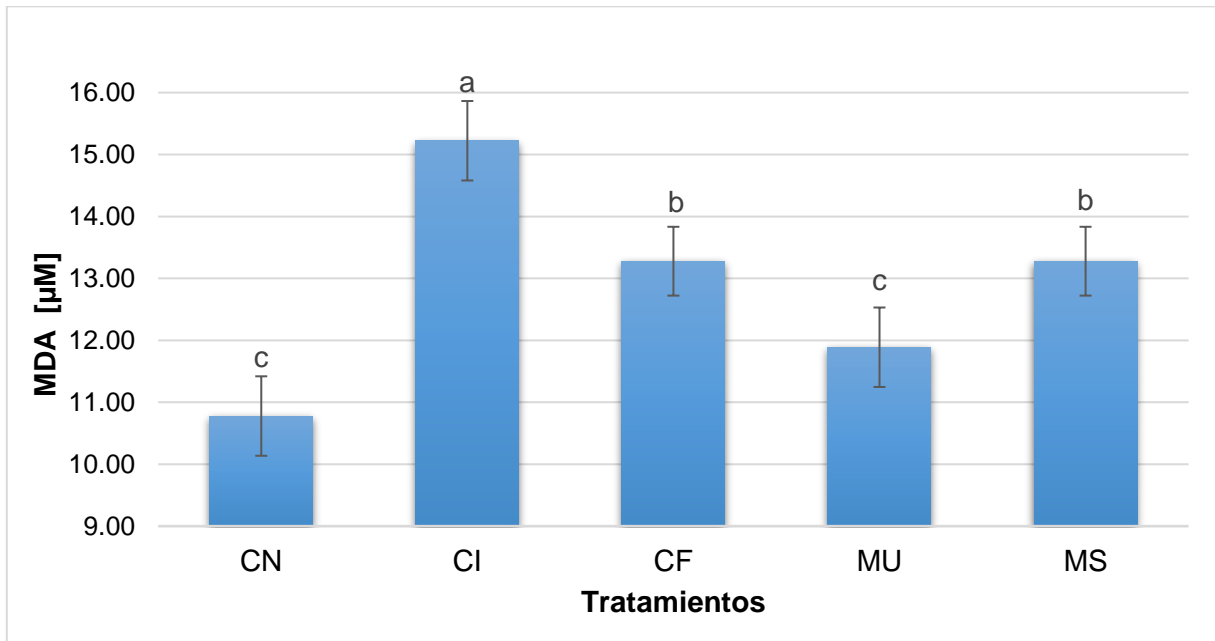


Figura 15. Cuantificación de MDA en el suero de rata macho *Wistar* con inducción de inflamación con carragenina 1%. Las barras representan el promedio \pm DE (n=4). Las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). ANADEVA con prueba post hoc de Tukey. CN: control normal (suero en estado basal); CI: control de oxidación (carragenina 1%); CF: control de fármaco (indometacina 0.1 mg Kg⁻¹); MU: extracto de callo irradiado de *M. candida* (0.6 mg Kg⁻¹); MS: extracto de suspensión de *M. candida* (0.6 mg Kg⁻¹).

Comparando con estudios realizados con extractos de plantas, se observó que el extracto de *Toona sinensis*, en dosis de 100 mg Kg⁻¹, por vía oral (v.o), inhibió un 57 % la concentración de TNF α (Hsiang *et al.*, 2013) y 300 mg Kg⁻¹ v.o del extracto de *Aporosa lindleyana* inhibió 59.27 % TNF α (Ali *et al.*, 2014). Por otro lado, Bottamedi *et al.*, (2020) evaluaron el extracto de *Myrocarpus frondosus* en dosis de 30, 100 y 300 mg Kg⁻¹ v.o, observando una disminución de la concentración de TNF α del 0, 10 y 30 %, respectivamente.

Diversos autores, administran el extracto por vía oral, sin embargo, la administración i.p resulta ser más efectiva para este tipo de evaluación. Miranda-Chávez *et al.* (2018),

utilizó la vía intraperitoneal para acelerar y garantizar la mayor absorción del extracto, dado que la vía de administración oral tiene la desventaja de ser más lenta debido a los procesos ADME, ya que el fármaco atraviesa por el tracto gastrointestinal antes de llegar al torrente sanguíneo hasta su diana (Clark *et al.*, 2012). Cuando un extracto se administra v.o debe ser en grandes dosis para garantizar su efecto, ya que algún metabolito bioactivo del extracto puede ser metabolizado antes de llegar a sitio de acción, disminuyendo así su actividad farmacológica (Miranda-Chávez *et al.*, 2018).

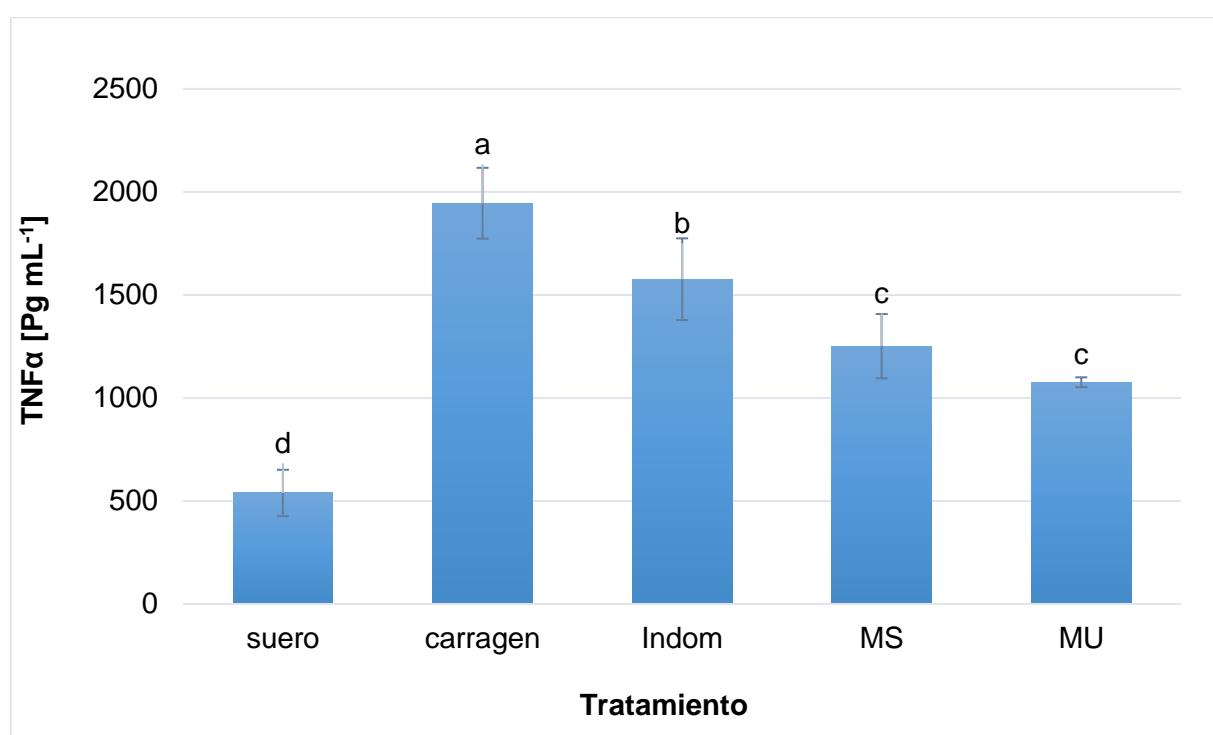


Figura 16. Actividad antiinflamatoria *in vivo* de extractos de cultivo *in vitro* de *M. candida*. Las barras representan el promedio \pm DE (n=4). Las letras indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$). ANADEVa con prueba post hoc de Tukey. MU: extracto de callo irradiado de *M. candida* (0.6 mg Kg^{-1}); MS: extracto de suspensión de *M. candida* (0.6 mg Kg^{-1}).

Comparando los resultados con otros extractos vegetales administrados vía i.p, se observó que los extractos de *M. candida* y *T. laui* ejercieron un efecto antiinflamatorio

similar a dosis mucho menores (0.6 mg Kg^{-1}) que los descritos en la literatura. Por ejemplo, los extractos de propóleo rojo brasileño y de una fracción purificada de saponina del extracto de raíz de *Ilex pubenses* a dosis de 10 y 25 mg Kg^{-1} , respectivamente, disminuyeron entre un 40 y 50 % la concentración de $\text{TNF}\alpha$ (Bueno-Silva *et al.*, 2016) Por otro lado, el extracto rico en betalainas de *Beta bulgaris* disminuyó la concentración de $\text{TNF}\alpha$ hasta un estado normal (Martinez *et al.*, 2015), sin embargo, la dosis empleada fue mucho mayor (100 mg Kg^{-1} i.p) que la dosis usada en este estudio.

Los metabolitos mayoritarios en los extractos de callos irradiados de *M. candida* son epicatequin demetil galato, apigenin xilósido glucósido, luteolin acetil glucósido y en las suspensiones control de *M. candida* digaloil ramnosa, epicatequin galato y ácido quínico (Reyes-Martínez, *et al.*, 2019). El epicatequin galato muestra actividad antiinflamatoria al inhibir los receptores TRF2 y TRADD (Kürbitz *et al.*, 2011), mientras que el ácido quínico disminuye la concentración de $\text{TNF}\alpha$ mediante la inhibición de la señalización de la MAPK y la fosforilación de p38MAPk, JNK, ERK $\frac{1}{2}$, así como la fosforilación de $\text{I}\kappa\beta$ en la señalización de $\text{NF}\kappa\beta$ (Jang *et al.*, 2017). En un ensayo *in vitro*, se determinó el mecanismo antiinflamatorio del apigenin glucósido al inhibir la fosforilación $\text{NF}\kappa\beta$ y la expresión de NLRP3 (inflammasoma) (Wang *et al.*, 2020).

En la mayoría de los casos, los compuestos fenólicos se encuentran en las plantas en su forma glucosídica y al ser metabolizados en el organismo, se libera la unidad del azúcar (Chanput *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2021). Se ha estudiado ampliamente el mecanismo antiinflamatorio del flavonoide luteolina y del ácido gálico. El primero actúa inhibiendo la forforilación de JAK, STAT 1/3 y TAK (Aziz *et al.*, 2018) y el segundo actúa inhibiendo la forforilación de $\text{I}\kappa\beta$ y la ruta de las MAPKs (Bai *et al.*, 2021). En la Figura 17 se esquematizan estos mecanismos.

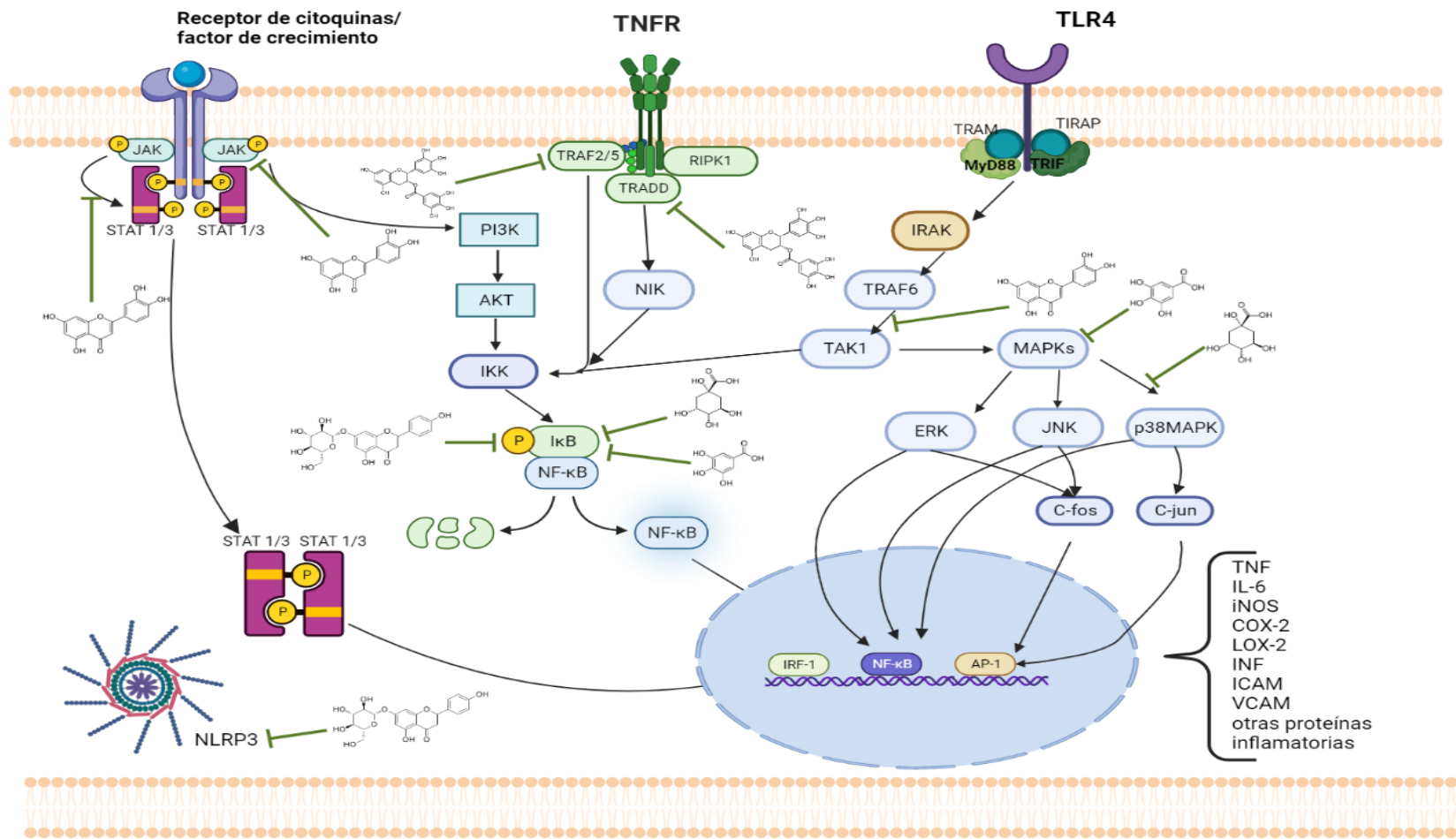


Figura 17. Mecanismo de acción de metabolitos mayoritarios en extractos de callos irradiados y suspensiones control de *M. candida*. Diagrama creado con BioRender.com

VII. Conclusiones

La inducción del estrés biótico en callos (luz UV) y estrés abiótico en suspensiones (quitosano) de *M. candida* y *T. laui* incrementó la producción de metabolitos secundarios. El mayor rendimiento de la extracción se obtuvo en los callos irradiados de *T.laui* (57%)

La actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de *M. candida* y *T. laui* mediante el ensayo de FRAP, mostró que los metabolitos presentes en los cultivos de *M. candida* y *T. laui* controles y sometidos a estrés poseen capacidad antioxidante para reducir el ion férrico. La mayor actividad antioxidante *in vitro* se obtuvo en los extractos de suspensiones control y estresados de *M. candida*, siendo mayor o igual a la vitamina E, respectivamente.

El extracto de callos irradiados de *M. candida* fue el más eficiente para inhibir la peroxidación lipídica, obteniéndose una actividad similar al fármaco de referencia indometacina.

Todos extractos de los cultivos de *M. candida* y *T. laui* presentaron actividad antiinflamatoria *in vitro* en células polimorfonucleares de bazo de rata y esta fue independiente de la concentración.

La mayor actividad antiinflamatoria *in vitro* (92%) se obtuvo con el extracto de callos irradiados de *M. candida*.

La capacidad antiinflamatoria *in vivo* de los extractos de callo irradiados y suspensiones control de *M. candida*, fue mayor que la ejercida por la indometacina.

Los metabolitos de los cultivos *in vitro* de *M. candida* y *T. laui* por su importante actividad antioxidante y antiinflamatorio, podrían usarse como una alternativa fitoterapéutica para las ECNT. Los resultados de este trabajo contribuyen a la implementación de técnicas biotecnológicas para lograr el aprovechamiento de las cactáceas endémicas de México, sin afectar las poblaciones naturales.

VIII. Bibliografía

- Agostini-Costa, T. ., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Ginemes, M. A. (2011). Secondary Metabolites. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 1, 155–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00018-0>
- Ahmad, K. A., Yuan Yuan, D., Nawaz, W., Ze, H., Zhuo, C. X., Talal, B., Taleb, A., Mais, E., & Qilong, D. (2017). Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension. *Free Radical Research*, 51(4), 428–438. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1322205>
- Ahn, K. (2017). The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. *BMB Reports*, 50(3), 111–116.
- Ali, Y., Alam, M. S., Hamid, H., Husain, A., Kharbanda, C., Bano, S., Nazreen, S., & Haider, S. (2014). Attenuation of inflammatory mediators, oxidative stress and toxic risk evaluation of *Aporosa lindleyana* Baill bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(3), 1513–1521. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.035>
- Altesor, A., & Ezcurra, E. (2003). Functional morphology and evolution of stem succulence in cacti. *Journal of Arid Environments*, 53(4), 557–567. <https://doi.org/10.1006/jare.2002.1059>
- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2018). Methods to Measure the Antioxidant Activity of Phytochemicals and Plant Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(13), 3324–3329. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01079>
- Arteaga-Figueroa, L. I. (2018). *Estudio de la vía de activación de macrófagos murinos de la cepa BALB/c expuestos al extracto de Bougainvillea xbuttiana*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. N. (2016). Anti-inflammatory activity of natural

products. *Molecules*, 21(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules21101321>

Aziz, N., Kim, M. Y., y Cho, J. &. (2018). Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 225(September 2017), 342–358. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.019>

Bai, Jin, Wang, Y., Zhu, X., & Shi, J. (2019). Eriodictyol inhibits high glucose-induced extracellular matrix accumulation, oxidative stress, and inflammation in human glomerular mesangial cells. *Phytotherapy Research*, 33(10), 2775–2782. <https://doi.org/10.1002/ptr.6463>

Bai, Jinrong, Zhang, Y., Tang, C., Hou, Y., Ai, X., Chen, X., Zhang, Y., Wang, X., & Meng, X. (2021). Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 133(September 2020),1-14. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110985>

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299(1995), 15–27. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)

Berger, R. G., Lunkenbein, S., Ströhle, A., & Hahn, A. (2012). Antioxidants in food: Mere myth or magic medicine? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(2), 162–171. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499481>

Bottamedi, M., Pereira dos Santos Nascimento, M. V., Fratoni, E., Kinoshita Moon, Y. J., Faqueti, L., Tizziani, T., Sandjo, L. P., Siminski, A., Dalmarco, E. M., & Mendes, B. G. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory action (*in vivo* and *in vitro*) from the trunk barks of Cabreúva (*Myrcarpus frondosus* Allemao, Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113545. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.113545>

- Bravo-Hollis, H. (1978). Las cactáceas en México. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Bueno-Silva, B., Franchin, M., Alves, C. de F., Denny, C., Colón, D. F., Cunha, T. M., Alencar, S. M., Napimoga, M. H., & Rosalen, P. L. (2016). Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. *Phytomedicine*, 23(13), 1583–1590. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.09.009>
- Cao, Y., Chen, J., Ren, G., Zhang, Y., Tan, X., & Yang, L. (2019). Punicalagin prevents inflammation in Ips-induced raw264.7 macrophages by inhibiting foxo3a/autophagy signaling pathway. *Nutrients*, 11(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu11112794>
- Carvajal-Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91–100.
- Cassells, A. C., & Curry, R. F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: Implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2), 145–157. <https://doi.org/10.1023/A:1010692104861>
- Chandra, S., Lata, H., & Varma, A. (2012). Biotechnology for medicinal plants: Micropropagation and improvement. In *Biotechnology for Medicinal Plants: Micropropagation and Improvement* (pp. 1–462). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29974-2>
- Chanput, W., Krueyos, N., & Ritthiruangdej, P. (2016). Anti-oxidative assays as markers for anti-inflammatory activity of flavonoids. *International Immunopharmacology*, 40, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.038>
- Chiocchio, I., Mandrone, M., Tomasi, P., Marincich, L., Poli, F., Trombetta, D., & Smeriglio, A. (2021). *molecules Plant Secondary Metabolites: An Opportunity for*

Circular Economy, 26 (491), 1-31 <https://doi.org/10.3390/molecules26020495>

- Clark, M. A., Finker, R., Rey, J. A., & Whalen, K. (2012). *Farmacología: Vol. 5ta ed.*
- Coronado H, M., Vega y León, S., Gutiérrez T, R., Vázquez F, M., & Radilla V, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Das, G., Lim, K. J., Tantengco, O. A. G., Carag, H. M., Gonçalves, S., Romano, A., Das, S. K., Coy-Barrera, E., Shin, H. S., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Heredia, J. B., & Patra, J. K. (2020). Cactus: Chemical, nutraceutical composition and potential biopharmacological properties. *Phytotherapy Research*. 1-36. <https://doi.org/10.1002/ptr.6889>
- Di Rosa, M., Giroud, J. P., & Willoughby, D. A. (1971). Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *The Journal of Pathology*, 104(1), 15–29. <https://doi.org/10.1002/path.1711040103>
- Dinarello, C. A. (2010). Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell*, 140, 935–950.
- Efferth, T. (2019). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. *Engineering*, 5(1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Elias-Rocha, M. A., Santos-Díaz, M. del S., & Arredondo-Gómez, A. (1998). Propagation of *Mammillaria candida* (cactaceae) by tissue culture techniques. *Haseltonia*, 6, 96–101.
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Estrada-Castillón, E., Villarreal-Quintanilla, J. Á., Rodríguez-Salinas, M. M., Encinas-

- Domínguez, J. A., González-Rodríguez, H., Figueroa, G. R., & Arévalo, J. R. (2018). Ethnobotanical Survey of Useful Species in Bustamante, Nuevo León, Mexico. *Human Ecology*, 46(1), 117–132. <https://doi.org/10.1007/s10745-017-9962-x>
- Ferreira, F. J., & Kieber, J. J. (2005). Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5), 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.013>
- Food and drug administration. (24 de octubre de 2022). *What is botanical drug?*
<https://www.fda.gov/about-fda/center-drug-evaluation-and-research-cder/what-botanical-drug>
- Garza-Padrón, R. A., Verde-Star, M. J., Morales-Rubio, M. E., Oranday-Cárdenas, A., Rivas-Morales, C., Núñez-González, M. A., & Barrón-González, M. P. (2010). Actividad amebicida, antioxidante y perfil fitoquímico de extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma* obtenidos de cultivos de callo y de cactus silvestre. *Polibotánica*, 30, 111–121.
- George, Edwin F., Hall, Michael A. & De Klerk, G.J. (2008). Plant propagation by tissue culture. In *springer* (Vol. 66).
- Gutierrez-Rojo, R. (1993). Evaluación de la actividad antimicrobiana de cactáceas producidas *in vitro* [Tesis de licenciatura]. *Universidad de Guadalajara Facultad de Ciencias Biológicas*.
- Hermans, N., Cos, P., Maes, L., De Bruyne, T., Vanden Berghe, D., J. Vlietinck, A., & Pieters, L. (2007). Challenges and Pitfalls in Antioxidant Research. *Current Medicinal Chemistry*, 14(4), 417–430. <https://doi.org/10.2174/092986707779941005>
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, A., & Lira, R. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of*

Ethnopharmacology, 88(2–3), 181–188. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00213-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00213-7)

Hernández, H. M. & Gómez-Hinostrosa, C. (2015). *Mapping the cacti of Mexico. Part II. Mammillaria* (Issue January). Succulent Plant Research. https://www.researchgate.net/publication/283222596_Mapping_the_cacti_of_Mexico_II_Mammillaria

Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

Hunt D.R. Taylor N.P, Charles G. & Bauer R. (2013). The new cactus lexicon illustrations. DH Books, Milborne Port.

Ifeoma, F., & Eneobong, E. (2008). Tissue culture in *Pinus caribaea* Mor. var. *Hondurensis* barr. and *golf*. II : Effects of two auxins and two cytokinins on callus growth habits and subsequent organogenesis. *African Journal of Biotechnology*, 7(6), 757–765. <http://www.academicjournals.org/AJB>

Itoh, H., Ueda, M., Suzuki, M., & Kohmura-Kobayashi, Y. (2022). Developmental Origins of Metaflammation; A Bridge to the Future Between the DOHaD Theory and Evolutionary Biology. *Frontiers in Endocrinology*, 13(February), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.839436>

Jang, S. A., Park, D. W., Kwon, J. E., Song, H. S., Park, B., Jeon, H., Sohn, E. H., Koo, H. J., & Kang, S. C. (2017). Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF- α -stimulated vascular smooth muscle cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96(October), 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.021>

Jayaraman, S., Daud, N. H., Halis, R., & Mohamed, R. (2014). Effects of plant growth regulators, carbon sources and pH values on callus induction in *Aquilaria malaccensis* leaf explants and characteristics of the resultant calli. *Journal of*

Forestry Research, 25(3), 535–540. <https://doi.org/10.1007/s11676-014-0492-8>

Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: Metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 76–90. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035>

Kalliolias, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>

Karaman, M., Tesanovic, K., Gorjanovic, S., Pastor, F. T., Simonovic, M., Glumac, M., & Pejin, B. (2021). Polarography as a technique of choice for the evaluation of total antioxidant activity: The case study of selected *Coprinus Comatus* extracts and quinic acid, their antidiabetic ingredient. *Natural Product Research*, 35(10), 1711–1716. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1628753>

Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00231-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00231-6)

Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Orborne, B. A. (2007). *Inmunología de Kuby*. Mc Graw Hill .

Koch, W. (2019). Dietary polyphenols-important non-nutrients in the prevention of chronic noncommunicable diseases. A systematic review. In *Nutrients*, 11 (5), 2-35. <https://doi.org/10.3390/nu11051039>

Kürbitz, C., Heise, D., Redmer, T., Goumas, F., Arlt, A., Lemke, J., Rimbach, G., Kalthoff, H., & Trauzold, A. (2011). Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic tumor cells. *Cancer Science*, 102(4), 728–734. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01870.x>

- Lee, D. hyo, Park, J. ki, Choi, J., Jang, H., & Seol, J. won. (2020). Anti-inflammatory effects of natural flavonoid diosmetin in IL-4 and LPS-induced macrophage activation and atopic dermatitis model. *International Immunopharmacology*, 89(March), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107046>
- Leva A. & Rinaldi L.M.R (2012). Recent advances in plant *in vitro* culture. IntechOpen
- Liao, W., Ning, Z., Chen, L., Wei, Q., Yuan, E., Yang, J., & Ren, J. (2014). Intracellular antioxidant detoxifying effects of diosmetin on 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress through inhibition of reactive oxygen species generation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(34), 8648–8654. <https://doi.org/10.1021/jf502359x>
- Lopes, A. H., Silva, R. L., Fonseca, M. D., Gomes, F. I., Maganin, A. G., Ribeiro, L. S., Marques, L. M. M., Cunha, F. Q., Alves-Filho, J. C., Zamboni, D. S., Lopes, N. P., Franklin, B. S., Gombault, A., Ramalho, F. S., Quesniaux, V. F. J., Couillin, I., Ryffel, B., & Cunha, T. M. (2020). Molecular basis of carrageenan-induced cytokines production in macrophages. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00621-x>
- Lozano Casanova, J., Barrios, M. A., & Pedrosa Amado, A. (1997). Radicales libres y antioxidantes, realidades y perspectivas. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 1(2), s.p.
- Martinez, R. M., Longhi-Balbinot, D. T., Zarpelon, A. C., Staurengo-Ferrari, L., Baracat, M. M., Georgetti, S. R., Sassonia, R. C., Verri, W. A., & Casagrande, R. (2015). Anti-inflammatory activity of betalain-rich dye of Beta vulgaris: Effect on edema, leukocyte recruitment, superoxide anion and cytokine production. *Archives of Pharmacal Research*, 38(4), 494–504. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0473-7>
- Martínez-Sánchez, G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I:

aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista cubana de farmacia*, 39(3), s.p.

Mathew, R., & Deepa Sankar, P. (2014). Comparison of major secondary metabolites quantified in elicited cell cultures, non-elicited cell cultures, callus cultures and field grown plants of *Ocimum*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 102–106.

Miranda-Chávez, H., Sakihara-Kobashigawa, W., Reyna-Orozco, P., Ricra-Morales, P., Mundaca-Villanueva, E., Muñoz-Villanueva, M., Pante-Medina, C., Castañeda-Castañeda, B., & Salazar-Granara, A. (2018). Influencia de la vía de administración sobre el efecto del extracto etanólico de la semilla de *Jatropha curcas* L., en la motilidad intestinal en ratones albinos. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*. 3 (1), 34. <https://doi.org/10.26722/rpmi.2018.31.79>

Narayani, M., & Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1227–1252. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>

Narro Robles, J. R. (2018). Enfermedades No Transmisibles Situación y Propuestas de Acción: Una Perspectiva desde la Experiencia de México. Secretaría de salud.

Nediani, C., & Giovannelli, L. (2020). Oxidative stress and inflammation as targets for novel preventive and therapeutic approaches in non communicable diseases. In *Antioxidants*, 9 (290). 1-6. <https://doi.org/10.3390/antiox9040290>

Noa Puig, M., Más Ferreiro, R., Mendoza Castaño, S., & Valle Clara, M. (2005). Revista Cubana de Farmacia. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(2), 297–308.

Oliveira, D. P., Moreira, T. V., Batista, N. V., Souza Filho, J. D., Amaral, F. A., Teixeira, M. M., Pádua, R. M., & Braga, F. C. (2018). Esterification of trans-aconitic acid improves its anti-inflammatory activity in LPS-induced acute arthritis. *Biomedicine*

and *Pharmacotherapy*, 99(November 2017), 87–95.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.009>

Organización Mundial de la Salud. (16 de septiembre de 2022). *Enfermedades No transmisibles*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

Ortega-Baes, P., & Godínez-Alvarez, H. (2006). Global diversity and conservation priorities in the cactaceae. *Biodiversity and Conservation*, 15(3), 817–827.
<https://doi.org/10.1007/s10531-004-1461-x>

Paine, M. F., & Roe, A. L. (2018). “Green Medicine”: The Past, Present, and Future of Botanicals. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 104(3), 410–415.
<https://doi.org/10.1002/cpt.1168>

Palomer, X. (2013). Implicación de la prostaglandina (PG)E2 y la vía de señalización de AMPc en la inducción de la expresión de la ciclooxigenasa 2 y la prostaglandina E2 sintasa microsomal-1 en macrófagos activados con lipopolisacárido. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 25(1), 46–48.
<https://doi.org/10.1016/j.arteri.2012.12.003>

Pereira Nacife, V., de Nazaré Correia Soeiro, M., Novaes Gomes, R., D’Avila, H., Caire Castro-Faria Neto, H., & de Nazareth Leal Meirelles, M. (2004). Morphological and biochemical characterization of macrophages activated by carrageenan and lipopolysaccharide *in vivo*. *Cell Structure and Function*, 29(2), 27–34.
<https://doi.org/10.1247/csf.29.27>

Perrot-Rechenmann, C., & Napier, R. M. (2005). Auxins. *Vitamins and Hormones*, 72(04), 203–233. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(04\)72006-3](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(04)72006-3)

Piang-Siong, W., de Caro, P., Marvilliers, A., Chasseray, X., Payet, B., Shum Cheong Sing, A., & Illien, B. (2017). Contribution of trans-aconitic acid to DPPHrad scavenging ability in different media. *Food Chemistry*, 214, 447–452.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.083>

- Popović, Z., Matic, R., Bojović, S., Stefanović, M., & Vidaković, V. (2016). Ethnobotany and herbal medicine in modern complementary and alternative medicine: An overview of publications in the field of I&C medicine 2001-2013. *Journal of Ethnopharmacology*, 181, 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.034>
- Restrepo, J.; Molina, D. (2011). Neuropsicología y funciones ejecutivas. In *Desarrollo y Transversalidad en Garcés-Giraldo* (Ed.). Corporación Universitaria Lasallista. <https://www.researchgate.net/publication/278667819>
- Reyes-Martínez A. (2019). *Efecto del estrés biótico y abiótico en la producción de metabolitos por cultivo in vitro de cactáceas y plantas herbáceas estudio de su actividad biológico en anillos de aorta y caracterización de los metabolitos mayoritarios* [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Reyes-Martínez, A., Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J., & Santos-Díaz, M. del S. (2019). Enhanced production and identification of antioxidants in in vitro cultures of the cacti *Mammillaria candida* and *Turbincarpus laui*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2583–2595. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09656-8>
- Reyes-Martínez, A., Valle-Aguilera, J. R., Gonzalez, C., & Santos-Díaz, M. del S. (2021). Vasorelaxant activity of metabolites present in *Mammillaria candida* and *Turbincarpus laui* in vitro cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147(1), 9–20. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02100-8>
- Robles-Martínez, M., Barba-De la Rosa, A. P., Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., & Santos-Díaz, M. D. S. (2016). Establishment of callus and cell suspensions of wild and domesticated *Opuntia* species: study on their potential as a source of metabolite production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124(1), 181–189. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0886-0>
- Rosas, M. M., De La Rosa, M. A. M., Goldammer, K. M., & Avila, V. M. C. (2001).

- Micropropagation of *Turbinicarpus laui* glass et foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 37(3), 400–404. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0070-6>
- Sadeghi, H., Hajhashemi, V., Minaiyan, M., Movahedian, A., & Talebi, A. (2011). A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. *European Journal of Pharmacology*, 667(1), 396–401. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.053>
- Santos-Díaz, M. del S., & Camarena-Rangel, N. G. (2019). Cacti for production of metabolites: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 8657–8667. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10125-5>
- Santos-Díaz, M. del S., Méndez-Ontiveros, R., Arredondo-Gómez, A., & Santos-Díaz, M. de L. (2003). Clonal propagation of *Turbinicarpus laui* Glass & Foster, a cactus threatened with extinction *Bradleya*, 21(21), 7–12. <https://doi.org/10.25223/brad.n21.2003.a3>
- Santos-Díaz, M. S., Pérez-Molphe, E., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2011). Mexican threatened cacti: Current status and strategies for their conservation. In *Species Diversity and Extinction* (pp. 1–59). Nova Science Publishers, Inc.
- Schmidt, B., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W. T., & Raskin, I. (2008). A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 57(1), S3-S9. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.03.001>
- Scossa, F., Benina, M., Alseekh, S., Zhang, Y., & Fernie, A. R. (2018). The integration of metabolomics and next-generation sequencing data to elucidate the pathways of natural product metabolism in medicinal plants. *Planta Medica*, 84(1), 855–873.
- Sen, C. K., & Packer, L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB Journal*, 10(7), 709–720. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.7.8635688>

- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, *18*, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, *4*, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, *71*, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005>
- Smeriglio, A., Denaro, M., Angelo, V. D., Germanó, M. P., & Trombetta, D. (2020). Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Properties of Citrus lumia Juice. *Frontiers in pharmacology*, *11* (593506). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.593506>
- Trout, K. (2014). *Cactus Chemistry By Species Light*. Mydriatic Productions.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, *552*(2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Torres-Moreno, H., Villegas-Ochoa, M. A., Ayala-Zavala, J. F., Robles-Zepeda, R. E., Wall-Medrano, A., & González-Aguilar, G. A. (2018). Gallic acid content and an antioxidant mechanism are responsible for the antiproliferative activity of ataulfo Mango Peel on LS180 cells. *Molecules*, *23*(695), 1–15.
- Wang, W., Yue, R. F., Jin, Z., He, L. M., Shen, R., Du, D., & Tang, Y. Z. (2020). Efficiency comparison of apigenin-7-O-glucoside and trolox in antioxidative stress and anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *72*(11), 1645–1656. <https://doi.org/10.1111/jphp.13347>
- WHO Report. (2019). WHO Global report on traditional and complementary medicine 2019. In *World Health Organization*.

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312342/9789241515436-eng.pdf?ua=1>

- Wu, D., Wang, Y., Zhang, H., Du, M., & Li, T. (2018). Acacetin attenuates mice endotoxin-induced acute lung injury via augmentation of heme oxygenase-1 activity. *Inflammopharmacology*, 26(2), 635–643. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0398-0>
- Wu, Y. hong, Li, Q., Li, P., & Liu, B. (2016). GSK621 activates AMPK signaling to inhibit LPS-induced TNF α production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 480(3), 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.001>
- Xie, H., Li, X., Id, Ren, Z., Qiu, W., Chen, J., Jiang, Q., & Chen, D. (2018). Molecules Antioxidant and Cytoprotective Effects of Tibetan Tea and Its Phenolic Components. *Molecules*, 23, 179. <https://doi.org/10.3390/molecules23020179>
- Zelová, H., & Hošek, J. (2013). TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62(7), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>
- Zhang, D., Tan, L., Yao, L., Tao, W., Gong, R., Luorong, Q., & Cao, W. (2020). *In Vitro* and *in Vivo* Antioxidative Activity against Radiation-Induced Damage and the Systematic Chemical Components of Different Extracts of *Lagotis breviflora* Maxim. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2020/9726431>
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283–333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>
- Zimmermann, G. R., Lehár, J., & Keith, C. T. (2007). Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discovery Today*, 12(1), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.11.008>

