



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS
BIÓTICOS



**Evaluación farmacológica de extractos de raíz y de callos
originados de distintos explantes de *Echinacea purpurea* (L.)
Moench**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

P r e s e n t a:

Q.A. Yadid Chávez Morales

D i r e c t o r a s d e t e s i s

Dra. Elsa Ventura Zapata y Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

Yautepec Morelos, Diciembre 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Morelos siendo las 12:00 horas del día 15 del mes de Noviembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CEPROBI para examinar la tesis titulada:

Evaluación farmacológica de extractos de raíz y de callos originados de distintos explantes de *Echinacea purpurea* (L.) Moench

Presentada por el alumno:

Chávez
Apellido paterno

Morales
Apellido materno

Yadid
Nombre(s)

Con registro:

B	1	0	1	2	2	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

La Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

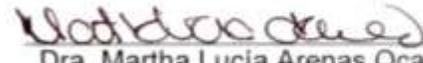

Dra. Elsa Ventura Zapata


Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

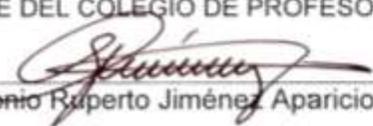

Dr. Antonio R. Jiménez Aparicio


Dra. Kalina Bermúdez Torres


M en C Araceli Solano Navarro


Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio



SEP IPN
CENTRO DE DESARROLLO
DE PRODUCTOS BIÓTICOS
YAUTEPEC, MOR.



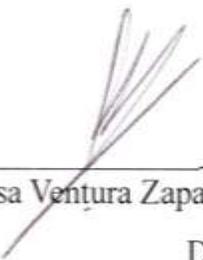
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIOTICOS (CEPROBI-IPN)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis “Evaluación farmacológica de extractos de raíz y de callos originados de distintos explantes de *Echinacea purpurea* (L.) Moench” es responsabilidad de la Dra. Elsa Ventura Zapata, la Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz y la Q.A Yadid Chávez Morales, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec Morelos, Diciembre 2012.

ATENTAMENTE



Dra. Elsa Ventura Zapata
Directoras de tesis



Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz



Q.A Yadid Chávez Morales
Alumna



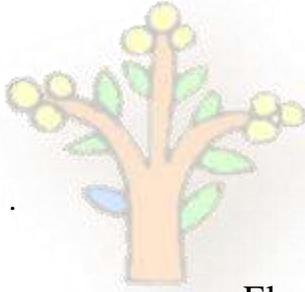
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Yautepec, Mor. siendo el día 30 del mes de Noviembre del 2012, la que suscribe Q.A Yadid Chávez Morales alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, con número de registro B101226, adscrito al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis, bajo la dirección de las Doctoras Elsa Ventura Zapata y Maribel Lucila Herrera Ruiz y cede los derechos del trabajo intitulado “Evaluación farmacológica de extractos de raíz y de callos originados de distintos explantes de *Echinacea purpurea* (L.) Moench”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deberán reproducir el contenido textual, gráficas, o datos del trabajo, sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, calle CEPROBI Número 8, Col. San Isidro, C.P. 62731, Apartado postal 24. Yautepec, Morelos, México, Tel (735) 3942020, (55) 57296000 Ext. 82500/82505, Fax: 82512. Correo electrónico: ceprobi@ipn.mx, página WEB (<http://www.ceprobi.ipn.mx>). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Q.A Yadid Chávez Morales



El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la, Dra. Elsa Ventura Zapata, en el laboratorio de “Cultivo de células y tejidos vegetales”, y en el Laboratorio de “Farmacología y Fitoquímica” del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS), bajo la dirección de la Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz. La investigación fue realizada con el financiamiento económico del proyecto de la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional SIP 20120569.

Para la realización de los estudios se obtuvo el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante una beca con número de registro 369819, y del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI).





Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento al Centro de Desarrollo de Productos bióticos, de manera muy particular al Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales por las facilidades otorgadas para la elaboración de este trabajo. De igual manera al Centro de Investigación Biomédica del Sur, en especial al Departamento de Fitoquímica y Farmacología por la oportunidad que me otorgaron para la realización del trabajo de investigación correspondiente a estas áreas.

Mi gratitud y mejores deseos a la Dra. Elsa Ventura Zapata, quien dirigió este trabajo, y por ser pieza vital en mi formación como Maestro en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos y mi desarrollo como persona. A los doctores Maribel Lucila Herrera Ruiz y Enrique Jiménez Ferrer, por su tiempo, atención, comprensión y por la oportunidad de trabajar en sus Laboratorios.

A los integrantes del comité tutorial Dr. Antonio R. Jiménez Aparicio, Dra. Kalina Bermúdez Torres y M. en C. Araceli Solano Navarro; de igual manera Al Dr. Alejandro Zamilpa y al M en C José Luis Trejo y a todas aquellas personas que contribuyeron de alguna manera a la realización del presente trabajo.

A todos, no encuentro las palabras precisas para agradecerles, solo me resta decir que su participación al igual que sus observaciones y aportaciones en beneficio del presente escrito, fue indispensable para su culminación.

Yadid Chávez Morales

Dedicatoria

A ti maestro por estar a mi lado y guiarme, aun en los momentos cuando no soy digna de tus bendiciones.

A mi madre Lorena Morales Rendón, que es mi inspiración hecha mujer y el ejemplo de ser humano a seguir..... ¡te amo tanto mama!

A Israel y Orlando porque son mi soporte, gracias por aguantarme y por compartir esta estancia a su ladoson increíbles hermanos.

A mi padre por apoyarme aun cuando la razón me ha faltado y porque crees en mi más de lo que yo misma confié.

A los ángeles que ahora me cuidan.....a pesar de no estar en su último aliento....les aseguro que estarán en mi último suspiro y pensamiento.....solo se adelantaron pero nos volveremos a encontrar. Mientras tanto los veo en mis sueños..... hasta el próximo abrazo.

A todos les agradezco por ser piezas imprescindibles en mi vida, porque lo que ahora soy se los debo a todos ustedes: mi familia, mis compañeros de vida. Se dice que escogemos con quien evolucionar, y yo me siento tan afortunada, porque ustedes me han llenado de luz. En esta vida y en la que sigue los amare por siempre....

“Sólo aquel que se consagra a una causa, con toda su fuerza y alma, puede ser un verdadero maestro. Por esta razón, ser maestro lo exige todo de una persona”.

*–Albert Einstein–
(1879-1955)*

Busca a los grandes maestros y presta atención! El camino es angosto y difícil de andar. Pero quien haya percibido alguna vez AQUELLO que ES, Incorpóreo, que no se Achica, ni Agrandá, Inmanifiesto para los sentidos, Independiente de tiempo y Profundo. ¡Deléitate y presta atención!..... aprende porque has encontrado solo el inicio.

*H.P. B
(cw, xii, 428)*

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.- INTRODUCCIÓN	3
2.- ANTECEDENTES	5
2.1 Inflamación	5
2.1.1 Mecanismos fisiopatológicos de la inflamación.....	5
2.1.2 Epidemiología de la inflamación.....	6
2.1.3 Modelos de inducción de inflamación.....	7
2.2 Ansiedad.....	8
2.2.1 Mecanismos fisiopatológicos de la ansiedad.....	9
2.2.2 Epidemiología de la ansiedad.....	11
2.2.3 Modelos biológicos de investigación preclínica de trastornos psiquiátricos.....	11
2.3 Tratamientos que combaten la inflamación y la ansiedad.....	13
2.4 Las plantas medicinales como alternativa en el tratamiento de la inflamación y los trastornos de ansiedad.....	16
2.5 Género <i>Echinacea</i> y su descripción botánica.....	16
2.5 <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench.....	17
2.5.1 Usos tradicionales y terapéuticos	17
2.5.4 Cultivo <i>in vitro</i> de la especie <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench.....	19
2.5.4.1 Cultivo de callo de <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench.....	21
2.5.4.2 Metabolitos secundarios constitutivos.....	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4.- HIPÓTESIS	25
5.- OBJETIVOS	26
a) Objetivo general.....	26
b) Objetivos particulares	26
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	27

6.1 Materiales.....	28
6.1.1 Material biológico	28
6.1.2 Materiales, equipos y reactivos	28
6.1.3 Medio de cultivo.....	29
6.2 Métodos.....	29
6.2.1 Protocolo de desinfestación y germinación de semillas de <i>E. purpurea</i>	29
6.2.2 Inducción de brotes adventicios a partir de fragmentos de raíz <i>E. purpurea</i>	30
6.2.3 Inducción del enraizamiento de brotes de <i>E. purpurea</i>	30
6.2.4 Inducción de callo a partir de hoja y raíz de <i>E. purpurea</i>	30
6.2.5 Cinéticas de crecimiento	32
6.2.6 Obtención de biomasa en peso seco y determinación de la humedad	32
6.2.7 Obtención de los extractos acuosos y etanólicos y cálculo del rendimiento	33
6.2.8 Identificación de alcaloides y flavonoides en el extracto acuoso y etanólico	34
6.2.9 Evaluación de la actividad antiinflamatoria y ansiolítica.....	34
6.2.10 Análisis estadístico.....	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
7.1 Obtención del material vegetal.....	39
7.1.1 Inducción de brotes adventicios a partir de fragmentos de raíz de <i>E. purpurea</i>	39
7.1.2 Inducción de enraizamiento de brotes de <i>E. purpurea</i>	42
7.1.3 Inducción de callo a partir de raíz y hoja de <i>E. purpurea</i>	47
7.2 Cinéticas de crecimiento	51
7.3 Obtención de los extractos e identificación de alcaloides y flavonoides	55
7.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria y ansiolítica.....	58
7.4.1 Evaluación de la actividad antiinflamatoria (mediante TPA)	58
7.4.2 Evaluación de la actividad ansiolítica (prueba de Claro-Oscuro)	60
7.4.3 Evaluación del efecto sedante (prueba de CA).....	63
7.4.4 Evaluación del efecto sedante (prueba de Potenciación de barbitúricos).....	66
8. CONCLUSIONES	69
9. PERSPECTIVAS	70
10.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Pág.
Figura 1	Mecanismo de Inflamación inducida por TPA.	8
Figura 2	Áreas del cerebro que participan en la fitopatología de la ansiedad.	9
Figura 3	Mecanismo de acción de las benzodiazepinas a nivel neuronal.	15
Figura 4	Diagrama de flujo de la metodología general del trabajo.	27
Figura 5	Protocolo de desinfestación de semillas de <i>E. purpurea</i> .	29
Figura 6	Procedimiento para la obtención de los diferentes extractos.	33
Figura 7	Modelo de exploración Claro-Oscuro.	36
Figura 8	Modelo de Campo abierto.	37
Figura 9	Evaluación de la inducción de brotes a partir de explantes de raíz de <i>E. purpurea</i> , con BAP 80.1 mg/l) a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días, n=100. ANOVA *p<0.05.	39
Figura 10	Imágenes fotográficas que muestran: a) Inducción de brotes de <i>E. purpurea</i> a los 14 días, b) El subcultivo de brotes de 42 días de edad en medio MS adicionado con BAP (0.1 mg/l).	40
Figura 11	Imágenes fotográficas que muestran: (a) Pelos absorbentes, (b) Regeneración y alargamiento de la raíz, (c) Raíz de 4.0 cm con punta blanca seguida de una coloración rojo-marrón. Durante la evaluación de inducción de brotes a partir de fragmentos de raíz, con BAP al 0.1 mg/l.	41
Figura 12	Respuestas evaluadas durante la inducción de rizogénesis en brotes de 1, 2 y 3 cm de altura con ANA (0.5 mg/l), evaluados por 6 semanas. a) Porcentajes brotes vitrificados y b) Porcentaje de brotes que formaron callo, n=40. ANOVA, *p<0.05.	43
Figura 13	Imágenes fotográficas que muestran: a) Callos formados en la base del tallo, en brotes de 1.0 cm, b) Callo formado en la base del tallo en brote de 2.0 cm. Evaluación realizada a los 42 días.	44
Figura 14	Raíces inducidas en brotes de 3 cm de altura con ANA (0.5 mg/l), n=40. ANOVA, *p<0.05.	44
Figura 15	Número promedio de raíces inducidas por semana en brotes de 3 cm con ANA (0.5 mg/l) desprendidos de la planta madre, n=40. ANOVA, *p<0.05.	46
Figura 16	Imágenes que muestran el sistema radicular formado por brotes de 3cm de altura y 6 semanas de edad, en medio MS adicionado con ANA (0.5mg/l).	46
Figura 17	Imágenes fotográficas que muestran durante su fase exponencial al: a) Callo de	49

	Hoja, b) Callo de Base del Tallo, c) Callo de Raíz, en una escala de 40x, d) Raíces (20x) y e) Cultivo en suspensión de las tres líneas de callo.	
Figura 18	Cinética de crecimiento del CB de <i>E. purpurea</i> en respuesta a 0.5 mg/l de ANA. a) Índice de crecimiento, b) Crecimiento en peso seco. Evaluación realizada durante 6 semanas.	52
Figura 19	Cinética de crecimiento del CH de <i>E. purpurea</i> en respuesta a 0.5 mg/l de 2, 4-D y 1.0 mg/l de KIN, en 6 semanas de evaluación. a) Índice de crecimiento, b) Crecimiento en peso seco. Evaluación realizada durante 6 semanas.	53
Figura 20	Cinética de crecimiento del CR de <i>E. purpurea</i> en respuesta a 0.5 mg/l de 2, 4-D y 0.25 mg/l de KIN, en 6 semanas de evaluación. a) Índice de crecimiento, b) Crecimiento en peso seco. Evaluación realizada durante 6 semanas.	54
Figura 21	Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de raíz y de callos de <i>E. purpurea</i> . a) Placa revelada con ácido fosfomolibdico y b) Placa revelada con 4-hidroxibenzaldehido.	56
Figura 22	Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de raíz y de callos de <i>E. purpurea</i> . a) Placas reveladas con 2-aminoetil difenilborinato (1% en metanol).	56
Figura 23	Evaluación del efecto antiinflamatorio de extractos de raíz y callos de <i>E. purpurea</i> , sobre el modelo de inducción por TPA. Administración tópica de 200 mg/kg. ANOVA, post-prueba Bonferroni * $p < 0.05$, $n = 5$.	59
Figura 24	Evaluación del efecto antiinflamatorio de extractos de raíz y callos de <i>E. purpurea</i> , sobre el modelo de inducción por TPA. Administración vía oral de 200 mg/kg. ANOVA, post-prueba Bonferroni * $p < 0.05$, $n = 5$.	59
Figura 25	Tiempo de permanencia en el lado claro (T. Claro) y número de cruces totales (# Cruces), durante la prueba de Claro-Oscuro. ANOVA, post-prueba Bonferroni, * $p < 0.05$, $n = 7$.	61
Figura 26	Tiempo de permanencia en el lado claro (T. Claro) y número de cruces totales (# Cruces), durante la prueba de Claro-Oscuro. ANOVA, post-prueba Bonferroni, * $p < 0.05$, $n = 7$.	63
Figura 27	Número de estiramientos verticales (EV) y Cruces totales (CT), que realizaron los ratones en CA, con la administración de 200 mg/kg. ANOVA, post-prueba Bonferroni, * $p < 0.05$, $n = 7$.	64
Figura 28	Número de estiramientos verticales (EV) y Cruces totales (CT), que realizaron los ratones en CA, con la administración de diferentes dosis de EECR. ANOVA, post-prueba Bonferroni, * $p < 0.05$, $n = 7$.	65

-
- Figura 29** Tiempo de duración y de latencia del efecto de la administración de diferentes tratamientos de igual dosis (200 mg/kg), diazepam (DZP1.0), vehículo (VEH) que realizan los ratones, n= 7. ANOVA, Bonferroni, *p<0.05. **67**
- Figura 30** Tiempo de duración y de latencia del efecto de la administración de diferentes dosis de extracto etanólico de callo de raíz (EECR), diazepam (DZP1.0), vehículo (VEH) que realizan los ratones, n= 7. ANOVA, Bonferroni, *p<0.05. **68**

ÍNDICE DE TABLAS

No.	Título	Pág.
Tabla 1	Factorial para evaluar la inducción de callo a partir de hoja/raíz de <i>E. purpurea</i> .	31
Tabla 2	Simbología utilizada durante la evaluación de inducción de callogénesis.	31
Tabla 3	Tratamientos usados en las pruebas farmacológicas.	35
Tabla 4	Respuestas observadas durante la evaluación de inducción de callogénesis en fragmentos de 0.5 cm de raíz de la especie <i>E. purpurea</i> .	47
Tabla 5	Respuestas observadas durante la evaluación de inducción de callogénesis en fragmentos de 0.5 cm de peciolo y lamina foliar de la especie <i>E. purpurea</i> .	48
Tabla 6	Parámetros cinéticos de las tres líneas de callos.	51
Tabla 7	Rendimientos y porcentajes de humedad de las diferentes líneas celulares de <i>E. purpurea</i> .	55

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μ	Velocidad específica de crecimiento (días ⁻¹)
μmol	Micromoles
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AA	Ácido araquidónico
AC	Acetato de ciproterona
AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido α -naftalenacético
ANOVA	Análisis de varianza
ATC	Antidepresivos tricíclicos
BA	Benciladenina
BAP	6-bencilaminopurina
BZD	Benzodiazepinas
CA	Campo Abierto
CB	Callo de base
CCTV	Cultivo de células y tejidos vegetales
CH	Callo de hoja
COX	Ciclooxigenasa
CO	Claro-Oscuro
CR	Callo de raíz
CRA	Extracto acuoso de callo de raíz
CRE	Extracto etanólico de callo de raíz
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CT	Sumatoria de número de cruces en periferia y centro del CA
DEX	Dexametasona
DZP	Diazepam
EC	Enfermedad de Crohn
EtOH	Etanol
EV	Estiramientos verticales
FP	N-forbil-péptidos
GABA	Ácido γ -amino butírico
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HPA	Eje hipotálamo-pituitaria-adrenales
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC	Índice de crecimiento porcentual
ICR	Ratones consanguíneos
IMAO	Inhibidores de la monoamino oxidasa
Indo	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible

ip	Vía intraperitoneal
kg	Kilogramos
KIN	Cinetina
LC	Lado claro
LEC	Laberinto elevado en forma de cruz
LO	Lado oscuro
M&S	Murashige and Skoog
MeOH	Metanol
NaOH	Hidróxido de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ps	Peso seco
RA	Extracto acuoso de raíz
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
RE	Extracto etanólico de raíz
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
TA	Trastornos de ansiedad
t_d	Tiempo de duplicación
TPA	12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato
UV	Ultravioleta
VEH	Vehículo
vo	Vía oral
X	Biomasa en un tiempo determinado
X₀	Biomasa inicial

RESUMEN

La especie *E. purpurea* es utilizada como planta ornamental y tiene múltiples usos en la medicina tradicional como inmunoestimulante y antiinflamatorio; dichos efectos ya han sido demostrados farmacológicamente, estas propiedades se asocian con los compuestos mayoritarios de la planta: derivados del ácido cafeico, diversas alcaloides y compuestos fenólicos. Las herramientas biotecnológicas tales como el cultivo de callos, representa una alternativa para la obtención de principios activos. Por lo que los objetivos del presente trabajo se encaminaron primero a la generación de material vegetal a través de la inducción de brotes y raíces, seguido de la inducción de callos mediante dos tipos de explante: raíz y hoja; que después se caracterizaron cinéticamente. Con este material se realizaron pruebas farmacológicas con la finalidad de determinar su efecto anti-inflamatorio y sobre sistema nervioso central, principalmente sobre la conducta de ansiedad.

La propagación de *E. purpurea* mediante la inducción de brotes adventicios a partir de fragmentos de raíz, se logró con BAP (0.1mg/l) y ANA, a una concentración de 0.5 mg/l generó el mayor porcentaje de enraizamiento de brotes de *E. purpurea*. En cuanto a la inducción de callo el uso de 2, 4-D en combinación con KIN estimula la división celular de los tejidos de raíz y de hoja para formar la masa celular. La base del tallo de esta especie en presencia de 0.5 mg/l de ANA formó callo. En cuanto a la cinética de crecimiento de las tres líneas, el proveniente de explantes de raíz mostró una velocidad de crecimiento mayor y un menor tiempo de duplicación ($\mu=0,4086 \text{ días}^{-1}$ y $T_d=1,69 \text{ días}$); todos los callos originados fueron friables. El extracto etanólico y acuoso de callo de raíz se evaluaron en las pruebas de claro-oscuro, campo abierto y potenciación de barbitúricos. Los resultados se compararon con los extractos de raíz cultivada *in vitro*, se observó que la dosis de 200 mg/kg de Extracto etanólico de callo de raíz (EECR) fue capaz de inducir un efecto ansiolítico en la prueba de claro-oscuro, asociado a un efecto sedante observado por una disminución de la actividad motora espontánea en el campo-abierto y un efecto de potenciación de pentobarbital. Por otro lado, ninguno de los tratamientos provenientes de los callos y de raíz de *E. purpurea* fueron activos en la prueba de inflamación auricular inducida por TPA. En este trabajo se muestra por primera vez que extractos provenientes del cultivo de callos de esta especie ejerce actividad farmacológica sobre SNC.

Palabras clave: *E. purpurea*, cultivo de callos, ansiedad, inflamación.

ABSTRACT

The species *E. purpurea* is used as an ornamental plant and has many uses in traditional medicine as an immunostimulant and anti-inflammatory, such effects have already been demonstrated pharmacologically, and these properties are associated with the majority of plant compounds: caffeic acid derivatives, and various phenolics alkaloids. Biotechnology tools such as callus culture, represents an alternative for obtaining active. So the objectives of this study were directed first to the generation of plant material through the induction of shoots and roots, followed by callus induction by two types of explant: root and leaf, which is then characterized kinetically. With these material pharmacological tests were performed in order to determine their effect on anti-inflammatory and central nervous system, primarily on anxiety behavior.

Propagation of *E. purpurea* by inducing adventitious shoots from root fragments was achieved with BAP (0.1mg/l) and NAA at a concentration of 0.5 mg/l produced the highest percentage of shoot rooting of *E. purpurea*. As for callus induction using 2, 4-D in combination with KIN stimulates cell division and root tissues of the leaf to form cell mass. The stem base of this species in the presence of 0.5 mg/l ANA callus formed. Regarding the growth kinetics of the three lines, from root explants showed a higher growth rate and lower doubling time ($\mu = 0,4086 \text{ days}^{-1}$ and $T_d = 1,69 \text{ days}$), all were friable callus originated. The aqueous ethanol extract and root callus were evaluated in the light-dark test, open field and potentiation of barbiturates. The results were compared with the root extracts cultivated in vitro, it was observed that a dose of 200 mg/kg of ethanolic extract of root callus (EECR) was able to induce an anxiolytic effect in the light-dark test associated with sedative effect observed by a decrease in spontaneous motor activity in the open field, and an enhancing effect of pentobarbital. Furthermore, none of the treatments from callus and root *E. purpurea* were active in the test of TPA induced inflammation handset. This paper first shows that extracts from the callus culture of this species exerts pharmacological activity on CNS.

Keywords: *E. purpurea*, callus culture, anxiety, inflammation.

1.- INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional es una alternativa no solo accesible sino útil, ha sido empleada desde tiempos añejos por las antiguas poblaciones en diferentes culturas, e involucra el uso de plantas medicinales. De acuerdo a la literatura destaca la especie *Echinacea purpurea* (L.) Moench, a la cual se le atribuyen propiedades con acción inmunoestimulante, antiinflamatoria, bactericida, antiviral, fúngica, antioxidante y recientes investigaciones en especies del mismo género son dirigidas a la evaluación de la actividad ansiolítica. Todos estos atributos se relacionan con los principios activos de la planta (derivados del ácido cafeico, diversas alcanoidas, flavonoides y compuestos fenólicos). La demanda de esta especie en los últimos años en países como EUA, Europa y Japón ha aumentado de manera relevante por sus múltiples aplicaciones, lo cual representa un reto para su cultivo masivo. Las herramientas biotecnológicas como el cultivo de callos representan una opción para la extracción de principios activos, sin alterar o amenazar la población nativa, además de la obtención de biomasa sin depender de los factores climáticos o geográficos que limiten la producción y obtención de extractos con actividad biológica, éste cultivo es utilizado para la manipulación genética de plantas y el estudio del metabolismo y de desarrollo celular de plantas.

Por otro lado, las enfermedades mentales así como las crónico-degenerativas cuyo fondo patológico es la inflamación, han aumentado considerablemente. En México, por ejemplo los trastornos mentales se clasifican como un problema de salud pública con un gasto de más de 2 mil millones de pesos al año. Aun cuando existen tratamientos útiles, estos tienen asociados efectos colaterales indeseables, por lo que el desarrollo de nuevos tratamientos a partir de fuentes naturales se ha expandido, sin embargo no existen en el mercado fitomedicamentos para el tratamiento de la ansiedad, eficientes y sin crear dependencia como los de síntesis. Por otra parte la inflamación es un proceso involucrado en numerosas patologías que afectan a un número considerable de personas; datos recientes apoyan el concepto de que este proceso es componente crítico de la progresión tumoral, artritis y enfermedades autoinmunes. En la actualidad existen medicamentos de origen sintéticos que auxilian o contrarrestan estos padecimientos, sin embargo la mayoría de ellos presentan efectos secundarios como irritación gástrica, toxicidad renal, alteraciones del sistema nervioso central, farmacodependencia, entre otras.

No obstante el cultivo de callo de la especie *E. purpurea* (L.) Moench con base en los antecedentes biotecnológicos, etnomédicos y farmacológicos representa una opción biotecnológica para la obtención de extractos con actividad antiinflamatoria y ansiolítica. Sin embargo y considerando que el callo puede desarrollarse en función del tipo de explante y de la disponibilidad de nutrientes disueltos en el medio, se planteó en el presente estudio, lograr el desarrollo *in vitro* de callos de hoja, raíz y base del tallo de la especie *E. purpurea*, y evaluar en modelos vivos ambas actividades farmacológicas utilizando extractos de alta polaridad de dichos cultivos.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Inflamación

Es una reacción completa y multifacética de los individuos ante un trauma; las vías y eventos particulares que se suscitan dependen de muchos factores, incluyendo la naturaleza del estímulo iniciador, su puerta de entrada al organismo y las características del huésped (Parslow *et al.*, 2002). Los cuatro signos de la inflamación fueron descritos por Paracelso (30 A.C al 38 D. C) y son: rubor (coloración roja), tumor (hinchazón), calor y dolor; posteriormente, Galeno (130-200 A. C) añadió un quinto signo: la pérdida de la función. La inflamación de acuerdo a su duración se divide en aguda (minutos, horas o días) y crónica (se prolonga por semanas, meses e incluso años), dependiendo del daño que la origine. (Muller, 2002). Cualquier agresión desencadena respuestas en tres niveles de organización: celular, tejidos y sistémica (órgano) (García, 2008).

La inflamación es ante todo una respuesta reparadora a favor de la supervivencia (proceso universal e inespecífico encaminado a restaurar la homeostasis); representa una reacción imprevista que incluye decisiones de puesta en marcha o de cese de múltiples respuestas humorales. El resultado final puede ser benéfico, perjudicial o ambos; debido a que estas respuestas usualmente surgen para inactivar o eliminar sustancias dañinas, o para evitar su diseminación a través del organismo; pero estas mismas pueden resultar deletéreas cuando dañan los tejidos huésped o interfieren con las funciones normales (Parslow *et al.*, 2002).

2.1.1 Mecanismos fisiopatológicos de la inflamación

Inicialmente la inflamación es un mecanismo de defensa de los individuos ante las agresiones del entorno, biológicas, químicas y/o físicas. La inflamación crónica puede ser definida como una forma no-regulada de la inflamación, y la aguda definida como la forma regulada. Cuando diferentes causas alteran o bloquean cualquiera de las etapas de este ordenado proceso, la inflamación puede derivar hacia soluciones no deseadas, que pueden llevar a un proceso de inflamación crónica el cual es un factor relevante en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, articulares, cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas (García, 2008).

Los primeros eventos asociados a la inflamación aguda, son la respuesta vascular y celular, en donde el área del tejido dañado empieza a dilatarse por un incremento en el flujo sanguíneo, las células del endotelio se “hinchán” y parcialmente se retractan, después inicia la exudación en la que los vasos presentan “fuga” de agua, sales y algunas proteínas plasmáticas como el fibrinógeno, las células polimorfo-nucleares, monocitos y linfocitos migran hacia el área dañada, todo este proceso genera los cuatro puntos cardinales de la inflamación (Biesma., *et al.*, 2001).

2.1.2 Epidemiología de la inflamación

Es importante considerar la inflamación y la consiguiente respuesta de fase aguda, como un proceso homeostático dinámico que involucra a los principales sistemas del organismo, a parte de los sistemas inmunológico, cardiovascular y nervioso central (SNC) (García, 2008). Por lo que en la actualidad existen múltiples enfermedades inflamatorias, de las más renombradas por afectar a gran parte de la población en México destacan:

- Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), que define a un grupo de enfermedades distintas, que comparten como característica el producir inflamación crónica en el tracto intestinal; los dos principales tipos son colitis ulcerativa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC) (Sandoval y Bosques, 2008).
- Enfermedad Inflamatoria Pélvica (EIP) (Secretaría de Salud Pública, 2008).
- Enfermedades Inflamatorias Oculares (Uveítis) (Treviño *et al.*, 2009).

Sin embargo el espectro de asociación a procesos inflamatorios es muy amplio en enfermedades autoinmunes clásicas, como la esclerosis múltiple, o en aquellas como el Alzheimer donde existe una respuesta inmune innata provocada por la producción local de proteína- β amiloide, e inclusive datos recientes apoyan el concepto de que la inflamación es un componente crítico de la progresión tumoral debido a que se ha hecho evidente que el microambiente tumoral está orquestado en gran parte por células inflamatorias (García, 2008). Esta respuesta del sistema inmunológico puede ser evaluada mediante técnicas *in vivo* e *in vitro*, estas últimas manejándose con éxito (Gabor, 2000).

2.1.3 Modelos de inducción de inflamación

En la actualidad existen distintos modelos para inducir la inflamación, utilizados para investigar un amplio abanico de eventos; sin embargo los modelos *in vivo* por las similitudes estructurales, bioquímicas y moleculares entre la reacción inflamatoria en humanos y animales, siguen siendo de mayor utilidad, no solo para confirmar en modelos animales los hallazgos previamente obtenidos, sino porque no siempre se dispone de la tecnología necesaria para realizar los modelos *in vitro*. La experimentación en animales es el único procedimiento que permite valorar en tiempo real el efecto de las interacciones genéticas, bioquímicas y medioambientales que provocan inflamación (Molina *et al.*, 2007). Los animales más utilizados son el ratón y la rata, por su fácil manipulación y el menor costo, además de que las técnicas utilizadas en ellos son sencillas, de corta duración, realizables con un reducido gasto de producto y no precisan instrumental costoso (Molina *et al.*, 2007). Algunos modelos de inducción de inflamación que presentan estas características son los utilizados en pabellón auricular, los cuales se basan en la aplicación de un agente irritante en la oreja. Los agentes más utilizados son los ésteres de forbol: PMA (acetato de forbol miristato) o TPA (acetato de tetradecanoil forbol) (Pérez *et al.*, 2001).

2.1.3.1 Modelo de inflamación inducida por TPA

El 12-O-Tetradecanoil forbol 13-acetato (TPA) posee notable actividad protumoral bien relacionada con su acción irritante, como ocurre con otros ésteres de forbol. El parámetro que mejor determina este efecto es el aumento de la liberación de ornitina descarboxilasa epidérmica. Una de las ventajas de este método, en el ámbito de los productos naturales, reside en la pequeña cantidad de muestra que requiere, debido a la acción local del agente flobógeno (Pérez *et al.*, 2001).

El mecanismo de acción por el cual actúa el TPA es la aplicación tópica de éste en el pabellón auditivo, lo cual provoca la inflamación con una serie de alteraciones y cambios bioquímicos como, la activación de la Proteína Cinasa tipo C (PKC) que activa a la fosfolipasa A₂, esta última enzima, degrada los fosfolípidos de la cara interna de la membrana, convirtiéndolos en ácido araquidónico (AA), de esta manera la actividad de la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2) empieza logrando convertir el AA en prostaglandinas (**Figura 1**). También el TPA presenta

acción sobre las concentraciones del Ca^{2+} intracelular, llevando a un aumento de este mensajero y activando a la PKC de esta manera mantiene activa esta enzima y promueve rápidamente la acción inflamatoria en la piel (Nakadate, 1989). Las reacciones que se desencadenan son: la formación de edema, infiltración de leucocitos polimorfonucleares, liberación de mediadores tipo eicosanoides, la desgranulación de mastocitos, se activa la cascada del ácido araquidónico; que en consecuencia favorecen la evaluación de sustancias inhibitoras de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Pérez *et al.*, 2001 y Carol *et al.*, 2000).

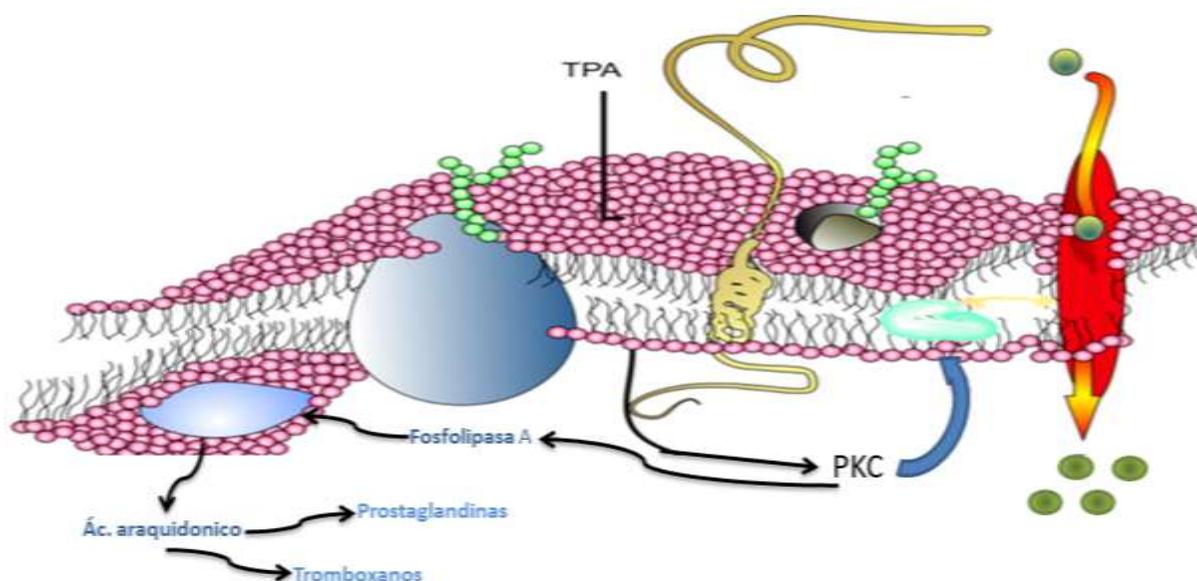


Figura 1. Mecanismo de Inflamación inducida por TPA. Fosfolipasa A2 (PLA2), Proteína cinasa C (PKC), Acido araquidónico (AA) (Adaptado de: Nakadate, 1989).

2.2 Ansiedad

La ansiedad es una respuesta fisiológica natural de los individuos a situaciones de amenaza externa o interna. La característica principal de este trastorno es el aumento de miedo y angustia, puede considerarse como patológica cuando estos síntomas son excesivos o incontrolables (Nash y Potokar, 2004); cuando sobrepasan determinados límites, se convierten en un problema de salud, impiden el bienestar e interfieren notablemente en las actividades sociales, laborales o intelectuales, ya que el individuo permanece en un estado de intranquilidad e inseguridad, pues la percepción de su entorno es irreal o distorsionadamente amenazante (Berkow, 1994). Se ha agrupado un número de trastornos que presentan la

ansiedad anormal, como principal síntoma, los cuales se han clasificado de la siguiente manera: trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de estrés agudo o postraumático, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de pánico (con o sin agorafobia), agorafobia (con o sin trastorno de pánico) y otras fobias (incluyendo la social) (Berkow, 1994).

2.2.1 Mecanismos fisiopatológicos de la ansiedad

En los trastornos de ansiedad (TA) participan algunas de las estructuras cerebrales que conforman el sistema límbico como el tálamo, hipotálamo, hipocampo y amígdala cerebral (**Figura 2**) (Kent *et al.*, 2002).

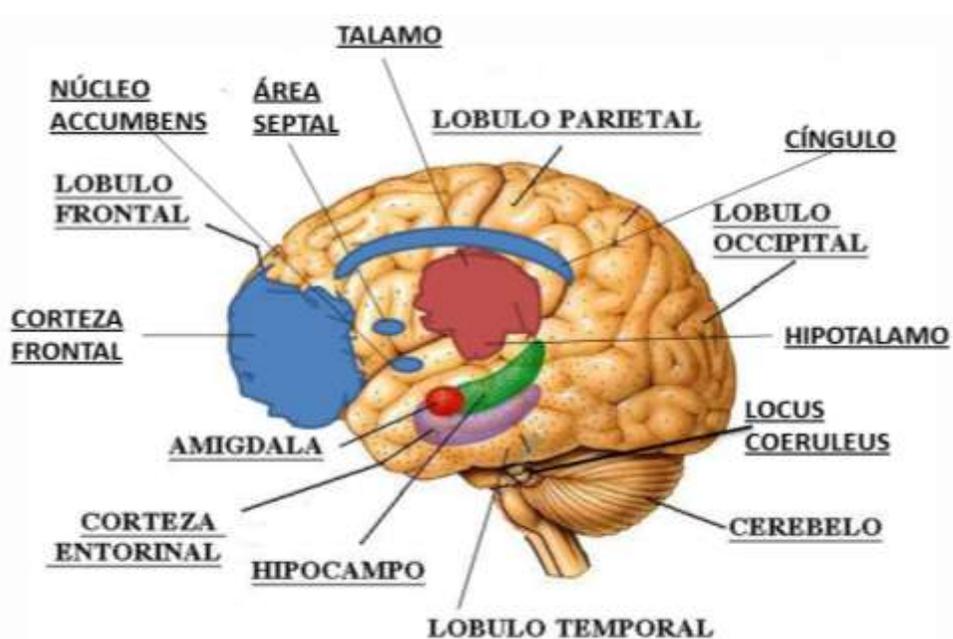


Figura 2. Áreas del cerebro que participan en la fisiopatología de la ansiedad (Adaptado de: Uriarte, 2005).

El sistema límbico está relacionado con la memoria, atención, instintos sexuales, emociones (por ejemplo placer, miedo, agresividad), personalidad y la conducta; por lo cual es el responsable de las emociones y las estrategias asociadas a la sobrevivencia. Las estructuras cerebrales que conforman el circuito de la ansiedad son varias, sin embargo, la corteza prefrontal (CPF) y la amígdala se consideran zonas con un papel primordial ya que específicamente gobiernan los sentimientos positivos y negativos de las emociones y por lo tanto modulan la calidad y estilo de vida de las personas por que detecta, coordina y mantiene las emociones que atemorizan a los individuos.

No obstante, cuando estas respuestas biológicas se salen de un rango fisiológico e inician un proceso de NO adaptación, donde hay una activación inapropiada o crónica, el proceso entonces, se torna patológico; de esta manera la amígdala es la responsable de la adquisición, regulación y expresión del miedo (Pare *et al.*, 2004). Paralelamente el hipocampo, el cíngulo anterior y la ínsula, también forman parte de este circuito y cada una de estas zonas contribuyen con diferentes componentes a la presencia de los trastornos de ansiedad (Davidson, 2002). Para que los organismos modulen las respuestas fisiológicas adecuadas ante los estímulos adversos y regulen los procesos de expresión de ansiedad dentro del complejo circuito neuroanatómico, es necesaria la participación de un conjunto de transmisión neuroquímica, los cuales son capaces de interactuar con determinadas células afectando la actividad de todo el neurocircuito. Algunos neurotransmisores involucrados son neuropéptidos, aminas como serotonina y norepinefrina, la hormona o factor liberador de la corticotropina (CRH/CRF), colecistoquinina (CCK), aminoácidos como glutamato y posiblemente el más estudiado de todos, el ácido γ -amino butírico (GABA) (Schousboe y Waagepetersen, 2008).

Uno de los principales neurotransmisores involucrados en la patología de los TA, es el GABA que es el inhibidor más importante del sistema nervioso central (SNC) ejerciendo su efecto a través de su unión con diferentes tipos de receptores, de los cuales destaca el complejo receptor-ionóforo de cloruro (GABA_A) (Schousboe y Waagepetersen, 2008). Los cuales se encuentran localizados sobre la membrana neuronal y están involucrados en el control de la coordinación motora, aprendizaje, memoria y de manera importante, en los procesos de epileptogénesis y de ansiedad (Vicini y Ortinski, 2004).

Se ha demostrado que las benzodiazepinas (BZD) y otros fármacos ansiolíticos ejercen sus acciones por la estimulación de estos receptores. La unión de sustancias con actividad ansiolítica, como el diazepam (una BZD), conducen a un incremento en la frecuencia de apertura del canal de iónico, con un consecuente aumento del flujo de iones Cl⁻ hacia el interior de la neurona. Esto provoca una hiperpolarización neuronal que produce un efecto inhibitorio de la excitabilidad celular, lo que induce el efecto ansiolítico o depresor (Stephenson *et al.*, 1994). Por el contrario, los antagonistas bloquean la apertura de los canales

iónicos, con la consecuente desinhibición neuronal, cuyo efecto produce una excitación que puede provocar convulsiones (Rodríguez y Contreras, 1998).

2.2.2 Epidemiología de la ansiedad

En el 2005 la Organización Mundial de la Salud reportó que 450 millones de pacientes son afectados por trastorno mental, neurológico o de comportamiento (OMS, 2005), los cuales generan sufrimiento afectando el entorno social de quienes los padecen, repercutiendo en la calidad de vida e incluso en la economía familiar y de los sistemas nacionales de salud, por el costo y el aumento en los índices de discapacidad (WHO, 2004). De los trastornos mentales, los TA representan los de mayor frecuencia, afectando una octava parte de la población mundial (OMS, 2001), estudios epidemiológicos recientes demuestran tasas de prevalencia del 13.6 y 28.8% en los países occidentales. Aparentemente, las fobias específicas son los subtipos de ansiedad más frecuentes y es menos común el trastorno obsesivo-compulsivo, pero menos del 30% de los individuos que sufren este padecimiento están bajo tratamiento médico.

En México este problema de salud contempla aproximadamente 15 millones de víctimas, representando el 14.5% de la población total del país (INEGI, 2005); frecuentemente este trastorno está asociado con depresión y con trastornos neuróticos (Cano y Tobal, 2000). En general los TA se presentan en etapas relativamente tempranas de la vida. De un 80 a 90% de los casos se manifiestan entre los 10 y 25 años de edad, periodo que parece ser el de mayor riesgo de desarrollar algunos de estos trastornos, sin embargo la sintomatología puede ser variable (Tanja *et al.*, 2007).

2.2.3 Modelos biológicos de investigación preclínica de trastornos psiquiátricos

Para validar el efecto de las plantas medicinales, se han propuesto diversos modelos biológicos, de los cuales, los animales constituyen una parte fundamental en la investigación preclínica de los trastornos psiquiátricos, ya que son empleados en la búsqueda de nuevos fármacos (antidepresivos y ansiolíticos), elucidación de los mecanismos de acción, causas genéticas y ambientales que afectan el SNC. Debido a que pueden inducir la aparición de síntomas similares a los del humano que sufren de una enfermedad psiquiátrica (Lapa *et al.*, 2002).

La mayoría de estos modelos se basan en el comportamiento, y se clasifican en aquellos que estudian respuestas condicionadas y no-condicionadas (donde la conducta de los animales es espontánea ante un ambiente desconocido), frente a un estímulo capaz de producir ansiedad en el humano. Entre los ampliamente utilizados destacan la prueba de nado forzado (efecto antidepressivo de sustancias), campo abierto (actividad motora espontánea), exploración de campo claro-oscuro (ansiedad) y potenciación de barbitúricos (sedación) (Zhang, 2004).

Prueba de **Campo Abierto**. Alrededor de los años 40s' la prueba de la actividad motora espontánea en campo abierto (CA) fue utilizada para medir el estrés en los animales. La valoración se sustentaba en la defecación, la deambulación, los estiramientos verticales (rearing) y horizontales (zapping). Cuando éstos disminuyen se debe probablemente a la adaptación del animal a la prueba y a la disminución de la emocionalidad. Experimentalmente se estableció la relación entre estas respuestas, lo cual fue ampliamente aceptado por los psicólogos y farmacólogos como un índice de emocionalidad (Dandiya *et al.*, 1970). Desde 1974 se tienen antecedentes de estudios utilizando agentes psicotrópicos en la prueba de CA, lo que ha permitido distinguir y definir la actividad exploratoria. Además demostraron que los estiramientos horizontales y verticales podían ser activados o inhibidos por agonistas o antagonistas de las catecolaminas, revelando una nueva utilidad del campo abierto para el estudio de fármacos ansiolíticos así como para el estudio y exploración de la ansiedad. En la actualidad, esta prueba es determinante ya que permite evaluar el efecto excitador o depresor del sistema locomotor (Prut y Belzung, 2003).

La prueba de exploración **Claro-Oscuro**, es un modelo para evaluar las respuestas condicionadas de miedo en ratas, considerando que los roedores sin entrenamiento previo, permanecen más tiempo en los lugares oscuros (LO) que en los claros (LC). Este modelo experimental consiste en someter al animal entre la tendencia a explorar libremente un ambiente completamente desconocido y evitar la luz brillante en el área abierta, midiendo el tiempo de permanencia en él LO *versus* LC, considerando también el número de transiciones entre los dos compartimentos. Este paradigma es útil en predecir la acción ansiolítica o ansiogénica de diferentes sustancias. La situación de conflicto natural está entre la tendencia a explorar y la tendencia inicial a evitar dicho espacio (neofobia). La actividad exploradora

refleja el resultado combinado de estas tendencias en situaciones nuevas. Así, en la prueba de claro-oscuro el incremento de la conducta que hace que el ratón se desplace y permanezca más tiempo en la parte iluminada se reportan como un índice de disminución de la ansiedad. Se ha reportado que los cruces son un índice de la actividad exploratoria, debido a la habituación sobre el tiempo, mientras que el tiempo que gastan los animales en cada compartimento refleja el nivel de aversión. Las sustancias que se consideran ansiolíticas clásicas como las benzodiazepinas, así como compuestos más novedosos como fármacos serotoninérgicos pueden mostrar su eficacia bajo este modelo etológico (Holmes *et al.*, 2001).

La prueba de **Potenciación de barbitúricos o Reflejo de enderezamiento**, se sustenta en la duración del efecto anestésico, hipnótico y relajante muscular del pentobarbital, que es un barbitúrico (medicamento hipnótico que causa sueño), el cual juega un papel importante en el despertar ya que deprime el sistema de activación reticular; paralelamente potencia los efectos inhibitorios de GABA al actuar sobre el receptor ionóforo de cloruro GABA_A, provocando depresión importante en el SNC, produciendo hiperpolarización y consecuentemente inhibición de las neuronas postsinápticas. Generalmente es de acción corta y sus efectos se observan tras los 30-60 s de administración (Dimarco, 1994).

2.3 Tratamientos que combaten la inflamación y la ansiedad

La inflamación usualmente se encuentra asociada a múltiples padecimientos, pues es una respuesta inmunitaria ante una agresión, por lo cual su tratamiento está en función de la causa de origen y de las características de la zona afectada; actualmente lo más frecuente es combatirla con medicamentos de origen sintético (Espinós *et al.*, 2009). Sin embargo, y a pesar del amplio espectro de fármacos antiinflamatorios, se reportan casos clínicos donde los medicamentos han causado efectos colaterales como: irritación gástrica, toxicidad renal, alteraciones del sistema nervioso central, náuseas, vómitos, dolor abdominal, ulceraciones en tracto digestivo, hemorragia oculta o masiva, diarrea, erupciones cutáneas, hipertensión, retención de agua y sodio, etc. Esto dependiendo de la dosis y el tiempo de administración (Espinós *et al.*, 2009 y Fleurentin y Pelt, 1990).

El tratamiento de los TA involucra la prescripción de más de un fármaco y para establecer un tratamiento adecuado es necesario el diagnóstico del tipo de trastorno de ansiedad, ya que esta

puede ocurrir de manera secundaria a desordenes médicos o ser parte de otros síndromes psiquiátricos. La diagnosis requiere del historial clínico, un examen físico y pruebas de laboratorio, incluyendo evaluación cognoscitiva y de comportamiento (Taylor y Reide, 1999). El uso de sustancias como las benzodicepinas para combatir los TA es muy común y data desde el siglo pasado debido a su acción rápida, eficacia y porque son bien toleradas (Davidson, 2002); el mecanismo por el cual actúan a nivel neuronal se describe en la Figura 3.

Sin embargo inducen efectos indeseables como somnolencia, mareo, sedación, perdida del equilibrio, disminución de la habilidad psicomotora, confusión, ansiedad muscular, depresión respiratoria y probablemente los más graves de todos: tolerancia y dependencia; que llegan a presentarse después de un tiempo mayor de 4 meses de administración y aumentan en relación directa con la dosis y la duración del tratamiento (Zjorumski e Isenberg, 1991). Algunos ejemplos de ansiolíticos destacados son: diazepam®, clonacepam®, aprazolam® (BZD); buspirona® (actúa sobre receptores a serotonina); propranolol (antagonista b-adrenérgico) y los antidepresivos (inhibidores de la recaptura de serotonina).

Por otra parte también se prescriben fármacos que actúan sobre el sistema de neurotransmisión serotoninérgico y noradrenérgico, tales como antidepresivos: inhibidores y selectivos de la recaptación de la serotonina y noradrenalina, inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO), antidepresivos tricíclicos (ATC), y azapironas (Mauk *et al.*, 1988). El uso de estas sustancias puede ser ventajoso, porque la ansiedad presenta un porcentaje de co-morbilidad con el desorden depresivo hasta de un 62% y con la distimia del 37% (Joffe *et al.*, 1996), sin embargo el efecto ansiolítico que generan ocurre hasta después de la administración sub-crónica (Rocca *et al.*, 1997). Algunos efectos colaterales a los antidepresivos son náuseas, sequedad de boca, visión borrosa, desorientación, alucinaciones, temblores, diarrea, insomnio, agitación, disfunción sexual e hipotensión postural. El síndrome de abstinencia que se presenta con el uso crónico de antidepresivos es menos severo que con las benzodicepinas, aunque se ha reportado que la suspensión del tratamiento produce recaídas. La interrupción del uso de estos fármacos puede provocar mareos, temor, vértigo, parestesia, confusión, problemas de memoria, dolor de cabeza y muscular, irritabilidad, ansiedad extrema, tensión nerviosa e inquietud (Nash y Nutt, 2005).

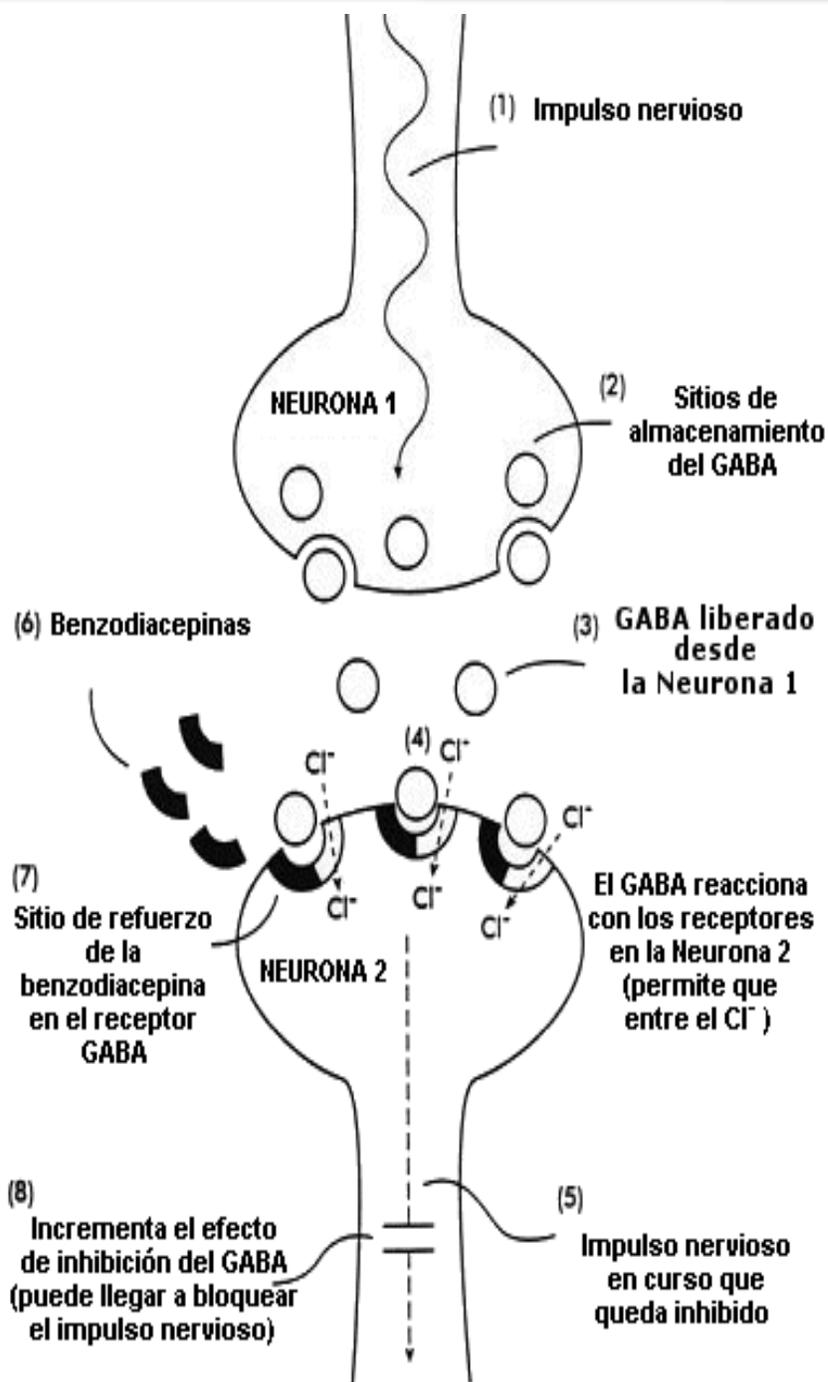


Figura 3. Mecanismo de acción de las benzodiacepinas a nivel neuronal. (1,2) Impulso nervioso que hace que el GABA sea liberado de los sitios en que está almacenado en la neurona 1. (3) El GABA liberado en el espacio interneuronal. (4) El GABA reacciona con los receptores de la neurona 2; la reacción permite la entrada de los iones de cloruro (Cl⁻) en la neurona. (5) Este efecto inhibe o detiene el progreso del impulso nervioso. (6,7) Las benzodiacepinas reaccionan con el sitio de refuerzo de los receptores GABA. (8) Esta acción aumenta los efectos inhibitorios del GABA; el impulso nervioso en curso puede quedar bloqueado completamente. (Tomado de: <http://www.psicofarmacos.info/contenido=ansioliticosfa>).

2.4 Las plantas medicinales como alternativa en el tratamiento de la inflamación y los trastornos de ansiedad

Por lo anterior a partir de la década de los 70's se retoma y da relevancia como alternativa, al uso de plantas medicinales, conocida como "medicina tradicional" (Fleurentin y Pelt, 1990). Existe en la literatura un número considerable de reportes acerca de extractos o de compuestos aislados de especies vegetales en todo el mundo, acerca de su efectividad antiinflamatoria y ansiolítica; convirtiéndose en un excelente recurso por explorar experimentalmente en la búsqueda de moléculas o sustancias efectivas para combatir estos padecimientos (Zhang, 2004). Entre las especies reportadas que más se han utilizado para combatir la inflamación es el género *Echinacea*, destacando la especie *Echinacea purpurea* (L.) Moench (*E. purpurea*) (Bauer *et al.*, 1991); estas propiedades inmunoestimuladoras se asocian con los compuestos mayoritarios de la planta (Ortega *et al.*, 2005). Además en investigaciones recientes en *Echinacea angustifolia*, se reporta que un extracto obtenido de la planta completa, presentó actividad sobre el SNC (ansiolítica) (Haller *et al.*, 2012).

2.5 Género *Echinacea* y su descripción botánica

El género *Echinacea* pertenece a la familia *Asteraceae*, del orden *Asterales*, de la clase *Magnoliopsida* y filo *Magnoliophyta*, el nombre del género se deriva de la palabra griega *Equinos* que significa erizo, en él se incluyen 11 taxones reconocidos de los cuales destacan tres especies; *E. angustifolia* DC, *E. pallida* (Nutt.) y *E. purpurea* (Bauer *et al.*, 1991). Las tres especies presentan actividad farmacológica por lo que son objeto de investigación científica en diversos países, además su elevada demanda en los últimos años, las convierten en especies potenciales para un comercio viable (Bauer *et al.*, 1991). Su distribución geográfica abarca desde las Montañas Ozark de Missouri Sur hasta el este de Oklahoma en E.U.A (McKeown, 1999). La mayoría de los taxones son diploides ($n= 11$). *E. pallida* y algunas poblaciones de *E. angustifolia* son tetraploide ($n= 22$) (Bauer *et al.*, 1991). Todas las especies del género *Echinacea* son herbáceas y perennes y se auto polinizan (McKeown, 1999); su flor por lo general es una roseta basal de hojas pecioladas similares a las margaritas con colores que van desde el blanco, rosa, magenta y púrpura a amarillo (Ortega *et al.*, 2005), poseen uno a varios tallos que surgen anualmente y una raíz principal, excepto *E. purpurea*, que tiene un sistema radicular fibroso (McKeown, 1999).

2.5 *Echinacea purpurea* (L.) Moench

Es una fanerógama originaria de E.U.A, su distribución es bastante amplia encontrándose desde el sur de Louisiana a Carolina del Norte, en Oklahoma y Kansas a través de la región central de Ohio, Kentucky y Tennessee; también se han encontrado poblaciones silvestres en Louisiana y Mississippi. Tiene una altura variable de entre 0.8 y 1.0 m; el tallo es áspero y presenta vellosidades; sus hojas son ovales, largamente pecioladas y dentadas; los capítulos florales son solitarios con flores de color púrpura a rojo intenso, de hasta 7 cm de longitud; las semillas son aquenios con cuatro líneas de dehiscencia; la raíz es cilíndrica, quebradiza y de corteza delgada (McKeown, 1999). En su estado silvestre no es abundante en comparación con otras especies de su género, apareciendo ejemplares aislados en suelos húmedos y lugares abiertos (Montero, 2001).

2.5.1 Usos tradicionales y terapéuticos

El empleo de *E. purpurea* data desde el siglo XVIII con las poblaciones nativas de América del Norte; actualmente es una especie utilizada como planta ornamental (Gruenwald *et al.*, 1998) y sigue gozando de gran reputación en la medicina tradicional (Eteghad *et al.*, 2010). Su aplicación es cada vez más amplia pues el uso popular de sus extractos se ha disparado en las últimas décadas y por consecuencia la demanda en el mercado va en aumento (McKeown, 1999), principalmente en países como Alemania, Suiza y Japón (Wagner y Jurcic, 2002). En Rusia es mezclada con el alimento del ganado para mejorar la resistencia a las enfermedades y mejorar la calidad de la leche producida (Letchamo *et al.*, 2002). En E.U.A es la planta más vendida como suplemento alimenticio en humanos y es la única especie que se ha domesticado; sin embargo el cultivo masivo representa una tarea importante y una serie de retos por superar (Ortega *et al.*, 2005).

Las prácticas tradicionales que se le dan son múltiples; se reporta que aplicada vía tópica ayudaba a combatir los malestares provocados por mordeduras de serpientes e influye favorablemente en la cicatrización de heridas, quemaduras, úlceras, forúnculos, acné, llagas en la boca, gingivitis, anginas y faringitis. La raíz era mascada por los nativos para combatir infecciones en la garganta o el dolor dental y la ingerían en caso de tos o envenenamiento (Wagner y Jurcic, 1991).

2.5.2. Estudios farmacológicos con actividad antiinflamatoria

Su propiedad antiinflamatoria se asocia con el contenido de equinacósido y alcanidas (Lalone *et al.*, 2010). Se ha demostrado esta actividad debido a que los extractos inhiben la ciclooxigenasa I (COX-I) así como la ciclooxigenasa II (COX-II), aunque esta última en menor medida (Ortega *et al.*, 2005 y Clifford *et al.*, 2002); ambas son responsable de la transformación del ácido araquidónico y tiene una función importante en los procesos inflamatorios (Madeiros *et al.*, 2007). En el 2002, Raso evaluó la actividad antiinflamatoria de *E. purpurea*, en el modelo de inducción de edema de pata de ratón mediante carragenina, administrándoseles vía oral 30-100 mg/kg, encontrando que sólo la dosis más alta inhibía significativamente la inflamación (Raso *et al.*, 2002).

Recientemente Vimalanathan en el 2009, evaluó varios extractos acuosos de raíces, hojas, tallos y en menor grado las flores, observándose que estos inhibieron fuertemente la secreción de las citocinas IL-6 y IL-8 (CXCL-8), y las proteínas pro-inflamatorias de células epiteliales bronquiales infectadas con rinovirus tipo 14 (Vimalanathan *et al.*, 2009). Santana en el 2011 comparó la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico obtenido de raíces de plantas cultivadas en hidroponía e *in vitro*, en un modelo de edema auricular inducido por TPA, en ratones consanguíneos (ICR). Obteniendo un 80.4 y 61.1% respectivamente de inhibición de la inflamación, esto se determinó por diferencia de pesos (2 mg en ratones dosificados con extracto, 10 mg en ratones no dosificados y 1 mg en ratones tratados con el control). A una concentración de 320 mg/ml se presentó el efecto antiinflamatorio estadísticamente igual al del control positivo (90 % de inhibición) la indometacina, un agente antiinflamatorio (Santana, 2011).

2.5.3 Estudios farmacológicos con actividad ansiolítica

En la actualidad no se tienen antecedentes de estudios farmacológicos con actividad ansiolítica en *E. purpurea*. Sin embargo, existe un estudio reciente que muestra el efecto ansiolítico de *Echinacea angustifolia* otra especie del mismo género. Se demostró que las dosis de 4, 6 y 8 mg/kg de un extracto (del cual no se mencionan las características) proveniente de esta planta, inducen un aumento significativo en el porcentaje de tiempo en que las ratas permanecen en los brazos abiertos de un laberinto elevado en forma de cruz (LEC), efecto que no está

asociado con cambios en la conducta motora, cuando esta es explorada en un CA. En este mismo estudio se evaluó el posible efecto tóxico del extracto a las dosis de 1000 y 3000 mg/kg, en ratas, prueba en la que no se observó letalidad, ni signos de daño neurológico.

Posteriormente a esto, una formulación farmacológica basada en el mismo extracto de *E. angustifolia* fue probado en voluntarios con TA, en un esquema de administración de 1 o 2 comprimidos al día durante 1 semana. Éstos contenían 20 mg de extracto de la planta, los datos fueron recolectados a través de un proceso técnico estructurado de auto-evaluación diaria. La dosis alta (2 comprimidos) redujo los síntomas asociados a la ansiedad dentro de los 3 primeros días, un efecto que se mantuvo estable durante el tratamiento (7 días) y las 2 semanas posteriores al mismo, la dosis baja (1 comprimido) no modificó significativamente los síntomas de este padecimiento (Haller *et al.*, 2012). Aunado a lo anterior el 01 de Agosto del 2012 “EuroPharma Inc” (Euro Pharma Quality Natural Medicines, Vitamins and Supplements) da a conocer su nuevo producto AnxioFit-1®, el cual posee la misma formulación de los comprimidos utilizados en la investigación realizada por Haller, y actualmente se comercializa como un fitomedicamento para el tratamiento de la ansiedad. La empresa EuroPharma ha destacado por ser innovadora en sus productos y es reconocida como la primera en introducir el sulfato de glucosamina y estandarizar el *Ginkgo biloba*. (<http://www.naturalproductsinsider.com/news/2012/08/study-echinacea-may-reduce-anxiety>).

2.5.4 Cultivo *in vitro* de la especie *Echinacea purpurea* (L.) Moench

Debido a la importancia de los metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria, inmunoestimuladora y posiblemente ansiolítica, se busca mediante herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro*, estandarizar su producción al lograr la multiplicación de células u órganos (Loaiza *et al.*, 2004). Lo cual representa un reto biotecnológico, pues establecer el cultivo de líneas celulares que sinteticen los metabolitos secundarios con actividad farmacológica y además permitan la extracción de estos, dependen de muchos factores como: la concentración de nutrientes, los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), la iluminación, temperatura y agitación, de los más relevantes (Crawford, 1995). El género *Echinacea* se ha micropropagado desde el 2001 por Harbaje, quien utilizó las especies *E. angustifolia*, *E. pallida* y *E. purpurea* con el fin de preservar un buen banco de germoplasma.

Para la propagación de *E. purpurea* utilizó semillas, puntas apicales y segmentos nodales; como RCV benciladenina (BA) para estimular la formación de brotes, el cual inhibió la formación de raíces, la mejor inducción que obtuvo fue de 1-3 brotes/explante al término de 6 semanas. El enraizamiento lo logró con facilidad en brotes aislados de cultivos inclusive sin la necesidad de adicionar reguladores de crecimiento al medio de cultivo. Comparando con las otras dos especies, la inducción de enraizamiento fue baja (Harbaje *et al.*, 2009).

Posterior a esto Gómez en el 2004, utilizando brotes y semillas evaluó la inducción de brotes con 6-bencilaminopurina (BAP) y el enraizamiento con ácido indolacético (AIA) en tres concentraciones diferentes, estableciendo así que las concentraciones óptimas para el crecimiento de esta especie son 0.5 mg/l de BAP con un logro de 12 brotes/explante y 3 mg/l de AIA para obtener un 90% de plántulas mayores a 2 cm con raíces de 3 cm de longitud (Gómez, 2004).

En el 2001 Choffe indujo la germinación *in vitro* de semillas utilizando dos medios de cultivo MS y B5 con 1.5 % de sacarosa. Posteriormente, analizó el potencial regenerativo de inducción de raíces, utilizando dos tipos de explantes (hipocótilos y cotiledones) y tres diferentes auxinas, ácido indolbutírico (AIA), IBA y ANA. Los resultados que reportó son que en hipocótilos bajo concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{mol/l}$ de IBA en el medio nutritivo se inducían 5-6 raíces por explante, mientras que en AIA a concentraciones de 5, 15 y 20 $\mu\text{mol/l}$ originaban 4.7, 4.2 y 4.5 raíces por explante respectivamente. En los explantes de cotiledones el cultivo con 50 $\mu\text{mol/l}$ de IBA mostró una mejor respuesta ya que indujo un promedio de 9.7 raíces por explante y en 15 $\mu\text{mol/l}$ 9.1 raíces/explante. Todas estas respuestas se evaluaron a los 28 d (Choffe *et al.*, 2001). En cuanto al cultivo de raíces, en el 2011 Santana logra obtener 13.2 raíces/explante con una longitud de 8 cm y peso de 0.9 g, a una concentración de 0.5 mg/l de ANA en medio MS al 100 % (Santana, 2011).

El cultivo *in vitro* de plántula y órganos de esta especie se ha extendido, y paralelamente se reporta el éxito del cultivo de callos y de células en suspensión, cuyos fines en la investigación científica son múltiples (análisis histológicos, fitoquímicos, farmacológicos etc.). Estas técnicas permiten tener independencia de la ubicación geográfica y de los factores climáticos

adversos que pueden limitar su producción en campo, un sistema de producción definido, una mayor consistencia en la producción (tanto en cantidad como en calidad) y menores tiempos de producción (Crawford, 1995).

2.5.4.1 Cultivo de callo de *Echinacea purpurea* (L.) Moench

Un callo es el crecimiento *in vitro* de una estructura vegetal amorfa, por lo general clorofílica, que se forma a partir de un fragmento de tejido, colocado sobre un medio de cultivo adecuado, y en cuyo desarrollo pueden observarse varias fases: La inducción (constituye la activación del metabolismo), la desdiferenciación y la división celular (se definen por los cambios en el tamaño, estructura y metabolismo de las células). El callo presenta un crecimiento exponencial de naturaleza radial, con una duración aproximada de 3-4 semanas antes de alcanzar la fase estacionaria, durante estas etapas, las células vegetales conservan la capacidad de mantener activas todas sus funciones metabólicas de manera indistinta al tejido de su procedencia, (totipotencia) (Slack, 2001).

Con respecto a *E. purpurea* este tipo de cultivo (de callos) se reporta a partir del 2001, donde Wayner logró obtener callo a partir de explantes de hoja y además determinó que el periodo de subcultivo óptimo para el mantenimiento del callo en medios MS suplementados con 0.5 mg/l de 2,4-D es de aproximadamente 30 d, las condiciones ambientales fueron: un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 de oscuridad y una temperatura de 22+1°C (Wayner, 2001). En el 2002 Koroch y colaboradores realizaron dos experimentos; el primero para la inducción de callo y brotes y el segundo para la inducción de raíz y regeneración de brotes a partir de secciones de hoja. En cuanto al primer experimento se evaluó en medio MS diferentes concentraciones de BAP y ANA. Obteniendo un alto número de brotes por explante (7.7 brotes/explante), los cuales al tener 1.5 cm de altura se transfirieron a medios con IBA para inducir raíz, el número más alto fue obtenido con 2.46 y 4.9 µM de IBA (4.8 raíces/explante). Pero en concentraciones más altas de 2.46 µM de IBA generaron callo en la base de los brotes y suprimían la elongación de las raíces. La frecuencia más alta de enraizamiento y de la longitud más larga de las raíces se presentó en una concentración de (0.49 µM) de IBA (Koroch *et al.*, 2002).

Hasta la fecha se ha reportado la inducción de callo a partir de hoja y de la base de brotes, sin embargo la mayoría de las investigaciones realizadas sobre el cultivo *in vitro* de *E. purpurea* son con fines de propagación y de obtención de extractos provenientes de tejidos u órganos formados (Liqing *et al.*, 2005). No obstante esto puede indicar que la síntesis de los principios activos en el vegetal se debe a una asociación de células muy especializadas (tejidos u órganos) (Schlatmann *et al.*, 1996). En este sentido es bien conocido que la biosíntesis de aminos y alcaloides tienen lugar en la mitocondria; en el caso del ácido caféico debido a su fitotoxicidad son almacenados en las vacuolas o bien pueden conjugarse con otros componentes de la pared celular (Edwards y Gatehouse, 1999).

Los metabolitos secundarios desempeñan un importante papel en la interacción de la planta con otros organismos (como sustancias de defensa frente a patógenos, fitófagos y estrés ambiental) (Levin, 1976). La defensa mediante compuestos químicos tiene dos vertientes: aquellos compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que están estructuralmente presentes en todas las etapas del desarrollo de las plantas, en alguna fase de su ciclo biológico o bien que son producidos después de una infección pero a partir de compuestos ya existentes y que algunos autores llaman inhibitinas (Grayer y Harborne, 1994) y otros fitoanticipinas o también compuestos constitutivos (VanEtten *et al.*, 1994).

2.5.4.2 Metabolitos secundarios constitutivos

Los productos del metabolismo primario son comunes a todas las especies de plantas y constituyen un número limitado de compuestos, mientras que los originados del metabolismo secundario presentan una mayor variedad al igual que su distribución entre especies de plantas, pudiendo incluso limitarse a una única especie o algunas especies relacionadas (Rhodes, 1994). Los metabolitos secundarios (MS) no se encuentran uniformemente distribuidos en la planta, sino que suelen localizarse en órganos determinados o en ciertos tejidos o células especializadas dentro de un órgano de la planta. Frecuentemente, el órgano donde se acumulan estos compuestos es diferente al de biosíntesis. Existen también los MS constitutivos, estos se sintetizan en todos los órganos o tejidos de la planta derivándose del metabolismo primario, pero se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis, a través de la redistribución de sus precursores por el xilema y/o floema, o por el espacio

apoplástico (Hashimoto *et al.*, 1967), su síntesis depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico, lo cual es importante para la supervivencia de las plantas (Rhodes, 1994).

En la actualidad, no existen reportes acerca de esta interacción celular en el género *Echinacea*, en particular en la especie *E. purpurea*, la mayoría de los estudios del cultivo *in vitro* se centran en el establecimiento del medio óptimo de crecimiento y la micropropagación (Paek *et al.*, 2009), y se desconoce por completo si los metabolitos secundarios con actividad farmacológica son específicos de la raíz o simplemente se ensamblan y acumulan en este órgano. Por otro lado, el cultivo de callo de diferentes órganos, representa una alternativa biotecnológica para el estudio fitoquímico y farmacológico de los metabolitos secundarios constitutivos en cada línea celular originada, considerando que este cultivo puede ser influenciado y depender directamente del tipo de explante (Palma, 1995).

3. JUSTIFICACIÓN

E. purpurea es una especie con múltiples usos en la medicina tradicional por atribuírsele actividad sobre el sistema inmunológico y recientemente en especies del mismo género destaca la actividad ansiolítica. No obstante su propagación mediante el cultivo tradicional ha sido muy difícil, debido a que la raíz es el órgano más utilizado, por lo cual su cultivo masivo representa un reto. Sin embargo, mediante el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* se buscan alternativas que permitan la propagación y la obtención de biomasa a gran escala, para la extracción y aprovechamientos de principios activos. Entre las técnicas biotecnológicas ampliamente utilizadas se encuentra el cultivo de callos, que permite la manipulación genética de plantas, micropropagación, estudios del metabolismo y de desarrollo celular de plantas, así como para la producción comercial de productos naturales (metabolitos primarios y secundarios).

Existen reportes sobre el establecimiento del cultivo de callos de *E. purpurea* para la micropropagación, la obtención y aislamiento de protoplastos e incluso para su estudio morfogénico e histológico. Sin embargo, considerando que el crecimiento, desarrollo celular y metabolismo bioquímico del callo puede ser influenciado por el tipo de explante (hoja, hipocótilo, raíz, base del tallo, flor); es interesante evaluar la calidad y cantidad de principios activos en extractos acuosos y etanólicos, provenientes de callos originados de tres diferentes órganos, de tal manera que pueda discernirse si la síntesis de los principios activos en esta especie, es influenciada por el tipo de explante o si se trata de metabolitos secundarios constitutivos.

En la actualidad no existen antecedentes, de la evaluación comparativa de la inducción de callogénesis, a partir de diferentes explantes complementada con un análisis químico y farmacológico, para descifrar si los callos cultivados *in vitro* sintetizan los metabolitos secundarios con actividad farmacológica. Con base en lo anterior se planteó la obtención de líneas celulares de callo originados de distintos explantes de *E. purpurea*, como material vegetal para su evaluación biológica en modelos animales de inflamación y ansiedad.

4.- HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes biotecnológicos, etnomédicos y farmacológicos del género *Echinacea*, los callos desarrollados de distintos órganos (hoja, raíz o tallo) de la especie *Echinacea purpurea* (L.) Moench presentarán características morfológicas que dependerán del tipo de explante de donde provienen; considerando además que la raíz es el sitio de acumulación de principios activos, entonces los extractos polares obtenidos del callo derivado de ésta presentarán el mayor efecto ansiolítico y/o antiinflamatorio en diferentes modelos biológicos, en comparación con los de la raíz cultivada *in vitro*.

5.- OBJETIVOS

a) Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria y ansiolítica de extractos polares obtenidos de callos provenientes de explantes de hoja, de raíz y de base del tallo de la especie *Echinacea purpurea* (L.) Moench, en comparación con los de la raíz cultivada *in vitro*.

b) Objetivos particulares

- Obtener material vegetal de *E. purpurea*.
- Caracterizar cinéticamente el crecimiento de callos de raíz, hoja y base del tallo.
- Determinar cualitativamente la presencia de los diferentes compuestos contenidos en los extractos etanólico y acuoso provenientes de líneas celulares de callos y raíz de *E. purpurea*, utilizando cromatografía en capa fina y reveladores específicos.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto acuoso y etanólico provenientes de callos y de raíz de *E. purpurea*, sobre el edema auricular de ratón inducido por TPA.
- Evaluar el efecto ansiolítico y sedante del extracto acuoso y etanólico provenientes de callos y de raíz de *E. purpurea* en ratón ICR mediante diferentes modelos biológicos.
- Caracterizar el extracto de mayor actividad biológica, mediante una curva dosis-respuesta, utilizando los modelos de campo abierto, claro-oscuro y potenciación de barbitúricos.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

En la **Figura 4** se muestra el esquema del desarrollo general del presente trabajo, el cual se realizó en el laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos CEPROBI-IPN, ubicado en Yauatepec Morelos, México; la sección farmacológica y fitoquímica se realizó en el Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS), ubicado en Xochitepec Morelos, México.

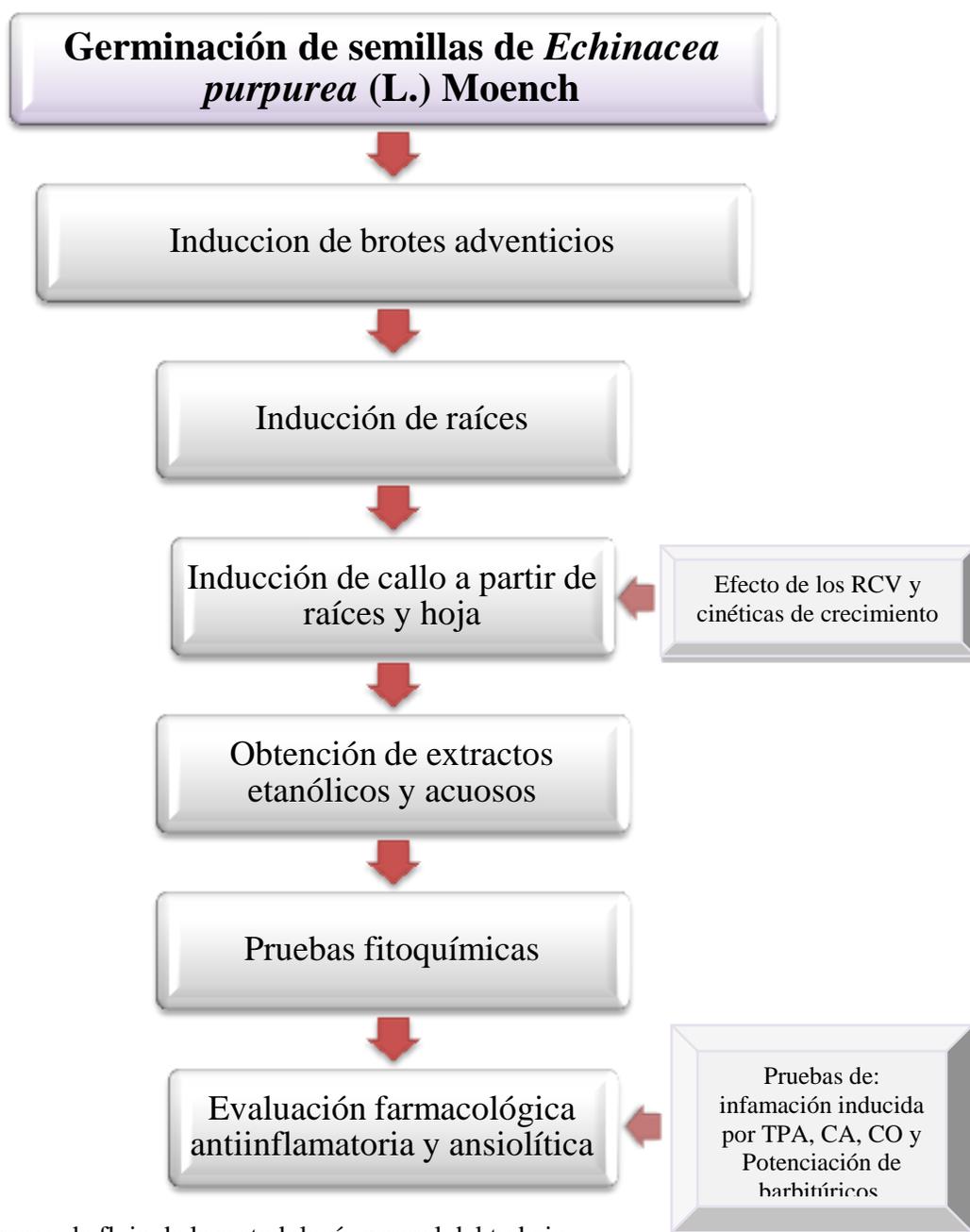


Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología general del trabajo.

6.1 Materiales

6.1.1 Material biológico

Material vegetal. Para la inducción de callogénesis se partió de semillas de la especie *E. purpurea*, compradas con el distribuidor comercial “Semillas Las Huertas”, las cuales previamente se desinfectaron para inducir su germinación en medio nutritivo bajo condiciones *in vitro*; posteriormente se propagó mediante la inducción de brotes a partir de fragmentos de raíz. De las plántulas obtenidas se utilizaron las hojas, raíces y base de tallo para la producción de callo.

Animales de experimentación. Para las pruebas biológicas se utilizaron ratones consanguíneos de la cepa ICR (machos) que fueron adquiridos con el distribuidor Harlan (México, D.F). Los cuales tenían un peso promedio de 35 g. El manejo de los animales de experimentación se llevó a cabo siguiendo la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 que se refiere a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

6.1.2 Materiales, equipos y reactivos

Los equipos empleados fueron: Autoclave eléctrica y de gas marca Aesa® modelo CV-250, potenciómetro Jenco Electronics® modelo 1670, rotavapor Heidolph® modelo B-490, liofilizadora Heto Drywinner®, sonicadora Cole Parmer® modelo 8850, congelador General Electric®, cámara UV UVP® modelo UVGL-58, balanza analítica Alliance® modelo 2695 y Microscopio óptico y Campana de flujo laminar (ALDER No. 5481). Los reactivos usados fueron: gelrite®, sacarosa, NaOH y HCl, Medio MS (Murashige and Skoog, 1962) marca Sigma Plot®, ANA, 2,4-D, Cinetina (Kin), BAP, metanol (CH₃OH), etanol (CH₃CH₂OH), agua destilada, benzal, acetona (CH₃CO CH₃) y cloroformo (CHCl₃); todos de grado reactivo.

En la prueba de exploración Claro-Oscuro se utilizó una caja de acrílico de 60 cm de largo por 28 cm de ancho, con paredes de 28 cm de alto, la abertura que conecta ambos lados es de 5 por 5 cm (**Figura 7**). Para el ensayo de Campo Abierto se utilizó un equipo de acrílico con paredes transparentes de 15 cm de altura y piso negro de 30/30 cm, dividido en 9 cuadrados de igual área (**Figura 8**). Para la prueba de Potenciación de barbitúricos se utilizaron cajas de acrílico transparente de 30/20 cm con paredes de 15 cm de alto.

6.1.3 Medio de cultivo

Medio de cultivo MS (Sigma M5519), adicionado con sacarosa (30 g/l) y Gelrite® (4 g/l) ajustado a pH 5.8 con NaOH y HCl 1N y 0.1N, según se requirió; se esterilizó a 121 °C (1.06 kg/cm²) por 17 minutos. Los RCV que se utilizaron en combinación para inducir la formación de callo en raíz y hoja fueron 2,4-D y Cinetina en concentraciones de 0.0-1.0 mg/l (Santana, 2011 y Gómez, 2004); para estimular la formación de brotes BAP (0.1 mg/l) y para el enraizamiento ANA (0.5 mg/l) (Santana, 2011). Las condiciones físicas en la cámara de cultivo fueron: fotoperiodo de 16 horas luz por 8 horas de oscuridad, 150-200 (μmol/m²s) y una temperatura de 25±2° C.

6.2 Métodos

6.2.1 Protocolo de desinfestación y germinación de semillas de *E. purpurea*

La desinfestación se llevó a cabo como se indica en la **Figura 5**. Las semillas libres de microorganismo se colocaron en medio de cultivo MS.

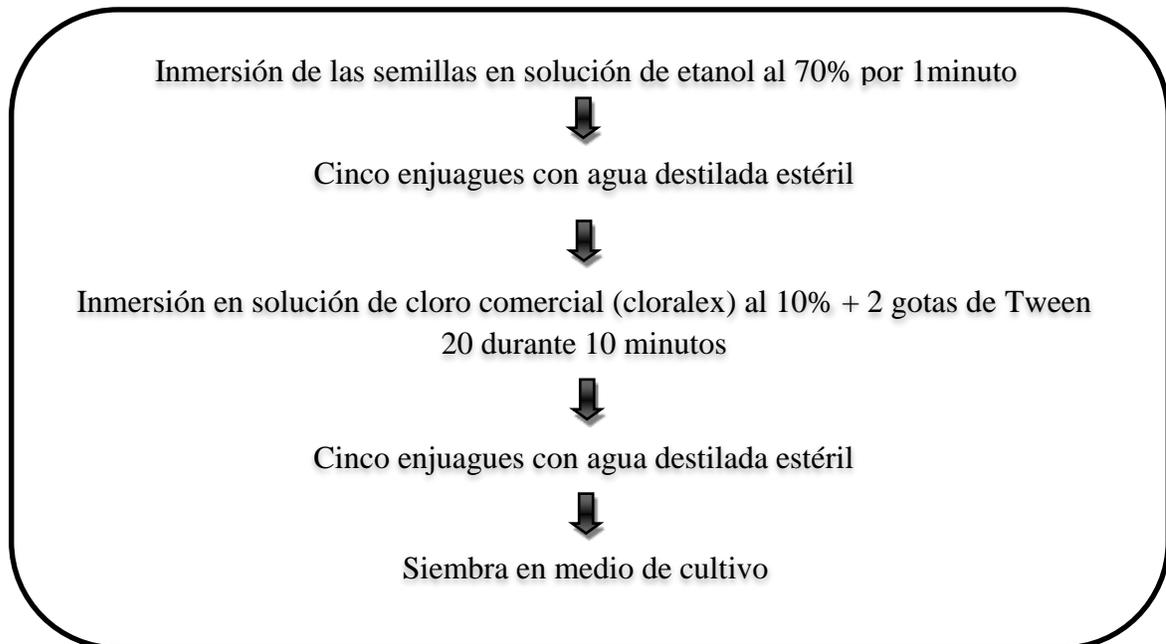


Figura 5. Protocolo de desinfestación de semillas de *E. purpurea* (Adaptado de: Loaiza *et al.*, 2004).

6.2.2 Inducción de brotes adventicios a partir de fragmentos de raíz *E. purpurea*

Se utilizaron 10 explantes de raíz por frasco, el cual contenía 20 ml de medio nutritivo MS al 100% + BAP (0.1 mg/l) (Santana, 2011). Las raíces de 8 semanas de edad y coloración rojo-marrón, se seccionaron en fragmentos de 1.5-2.0 cm de longitud. Se realizaron 20 repeticiones en total y cada 7 días por un periodo de 6 semanas fueron evaluadas.

Para obtener el número de brotes por explante se aplicó la ecuación (1):

$$\text{Número de brotes/explante} = \frac{\text{Número de brotes generados}}{\text{Número de explantes}} \quad (1)$$

6.2.3 Inducción del enraizamiento de brotes de *E. purpurea*

Se evaluaron brotes de tres altura 1.0, 2.0 y 3.0 cm, los cuales se sembraron en medio nutritivo MS al 100% adicionado con ANA (0.5 mg/l) (Santana, 2011). Se colocaron 4 explantes por frasco (10 frascos por tamaño de brote), y la inducción de rizogénesis se evaluó cada 7 d por un periodo de 6 semanas. La unidad experimental consistió de un brote, las repeticiones realizadas fueron 10 y n=40 para cada tamaño de brote.

6.2.4 Inducción de callo a partir de hoja y raíz de *E. purpurea*

La inducción de callogenésis en fragmentos de raíz y hoja se evaluó mediante un diseño factorial completamente al azar (**Tabla 1**) y 2 tratamientos más a los cuales no se les adiciono reguladores solo se disminuyó la concentración de sales. Los fragmentos de tejido vegetal fueron colocados en medio de cultivo semisólido con la concentración de RCV según correspondiera; en el caso de hoja se utilizó el pecíolo (P) y la lámina foliar (LF) por separado, colocándose 9 fragmentos de cada uno por frasco. El diseño experimental fue el mismo para ambos tipos de órganos (Wayner, 2001).

Los callos obtenidos de raíz se designaron con la abreviatura CR los de hoja CH. La unidad experimental fue el explante, se realizaron 3 repeticiones y n=27, en cada tratamiento.

Tabla 1. Factorial para evaluar la inducción de callo a partir de hoja/raíz de *E. purpurea*.

Auxinas/2-4-D	Citocininas/KIN				
Tratamientos (mg/l)	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
0.00	A	B	C	D	E
0.25	F	G	H	I	J
0.50	K	L	M	N	Ñ
0.75	O	P	Q	R	S
1.00	T	U	V	W	X
MS al 25%					
MS al 50%					

Las variables evaluadas fueron: tiempo de inducción de callogénesis, color del callo y consistencia (friabilidad); también se consideró la formación de raíces secundarias y pelos absorbentes, la elongación del explante y la vitrificación; la cual se determinó cortando el explante con ayuda de un bisturí y si estaba endurecido y mantenía una apariencia cristalina se clasificó como explante vitrificado.

Para definir la friabilidad de los callos, se tomó un inóculo de 0.5 g y se introdujo en un matraz que contenía medio nutritivo líquido, el cual se sometió a una agitación constante de 100 rpm durante 2 minutos. De esta manera si se observa la disgregación de las células se decía que eran friables. Los tres tipos de callos se disgregaron por completo e inclusive se observó el crecimiento del cultivo (**Figura 17e**). De tal manera que se mantuvieron esas líneas celulares para obtener rendimientos de biomasa y de sus extractos, sin realizarse cinética de crecimiento. Durante la inducción de callos en explantes de hoja, se consideró la respuesta de oxidación del tejido. Para facilitar la medición de los parámetros anteriores se estableció una simbología la cual se manejará en todo el escrito (**Tabla 2**). Los callos obtenidos se separaron de los explantes y se subcultivaron cada 21 d bajo iguales condiciones de temperatura y fotoperíodo.

Tabla 2. Simbología utilizada durante la evaluación de inducción de callogénesis.

Consistencia		Color		Otras características	
Friable	F	Verde	V	Elongación de explante	EE
No friable	NF	Café Marrón	CM	Formación de raíces secundarias	FRS
		Café	C	Oxidación	O
		Blanco	B	Vitrificación	V
		Incoloro	I	Formación de callo	FDC

6.2.5 Cinéticas de crecimiento

La caracterización cinética del crecimiento de los callos, se realizó colocando un inóculo inicial de 1 g de callo en peso fresco, según correspondiera al tratamiento; posteriormente cada 7 d se pesaron los callos de 5 frascos, para ello, se colocaron sobre una caja Petri cuyo peso se conocía, después se colocaron en una estufa de vacío a una temperatura de 60 °C, por 48 h, se enfrió en desecador y se pesó nuevamente, finalmente por diferencia de pesos con respecto a la caja Petri se obtuvo el peso seco. El crecimiento se determinó mediante la velocidad específica de crecimiento (μ) (d^{-1}) y por el índice de crecimiento porcentual (IC%) (Wayner, 2001). Para determinar la velocidad específica de crecimiento se consideraron los datos logarítmicos del crecimiento en base al peso seco de callos de *E. purpurea*, la cual correspondió al valor de la pendiente del gráfico obtenida del logaritmo de biomasa *versus* tiempo; una vez obtenida se utilizó para calcular el tiempo de duplicación (t_d), a través de la ecuación (2):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (2)$$

Donde:

(μ)=velocidad específica de crecimiento, (Ln)=logaritmo natural, (t_d)=tiempo de duplicación.

Por su parte el índice de crecimiento (%) se calculó mediante la ecuación (3):

$$IC = \frac{(X - X_0)}{X_0} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

(X)= peso seco final de los callos, (X_0)= peso seco inicial de los callos, (IC)= índice de crecimiento.

6.2.6 Obtención de biomasa en peso seco y determinación de la humedad

Se cosecharon los callos de los tres tratamientos, se eliminó el exceso de humedad con una toalla de papel, enseguida se colocaron en cajas Petri dentro de una estufa de secado por 5 d a 60 °C, cada 24 h los callos se pesaron hasta obtener un peso constante (sequedad), este procedimiento se realizó por triplicado en cada tratamiento (Wayner, 2001).

6.2.7 Obtención de los extractos acuosos y etanólicos y cálculo del rendimiento

La biomasa seca obtenida de los tres tipos de callos, por separado se trituró en un mortero de porcelana hasta la obtención de un polvo, después se colocó en un recipiente de vidrio para su maceración en 250 ml de etanol durante 48 h (1:3 p/v, gramos de muestra por ml⁻¹ de solvente), se filtró en papel Watman del No. 1 y el residuo sólido se maceró en metanol por 2 h. Nuevamente se filtró y el residuo se dejó macerando en agua destilada por 48 h más, todas las maceraciones se realizaron a temperatura ambiente.

Finalmente, el producto filtrado se concentró en un evaporador rotatorio a presión reducida y una temperatura de 50 °C, con agitación constante de 70 rpm, en matraces bola cuyo peso constante se conocía (**Figura 6**). Todos los extractos se liofilizaron a una temperatura de -70 °C durante 3 h. Posteriormente los matraces se pesaron, y por diferencia de peso se obtuvo el rendimiento total (Santana, 2011), se realizaron 3 repeticiones para cada línea celular.

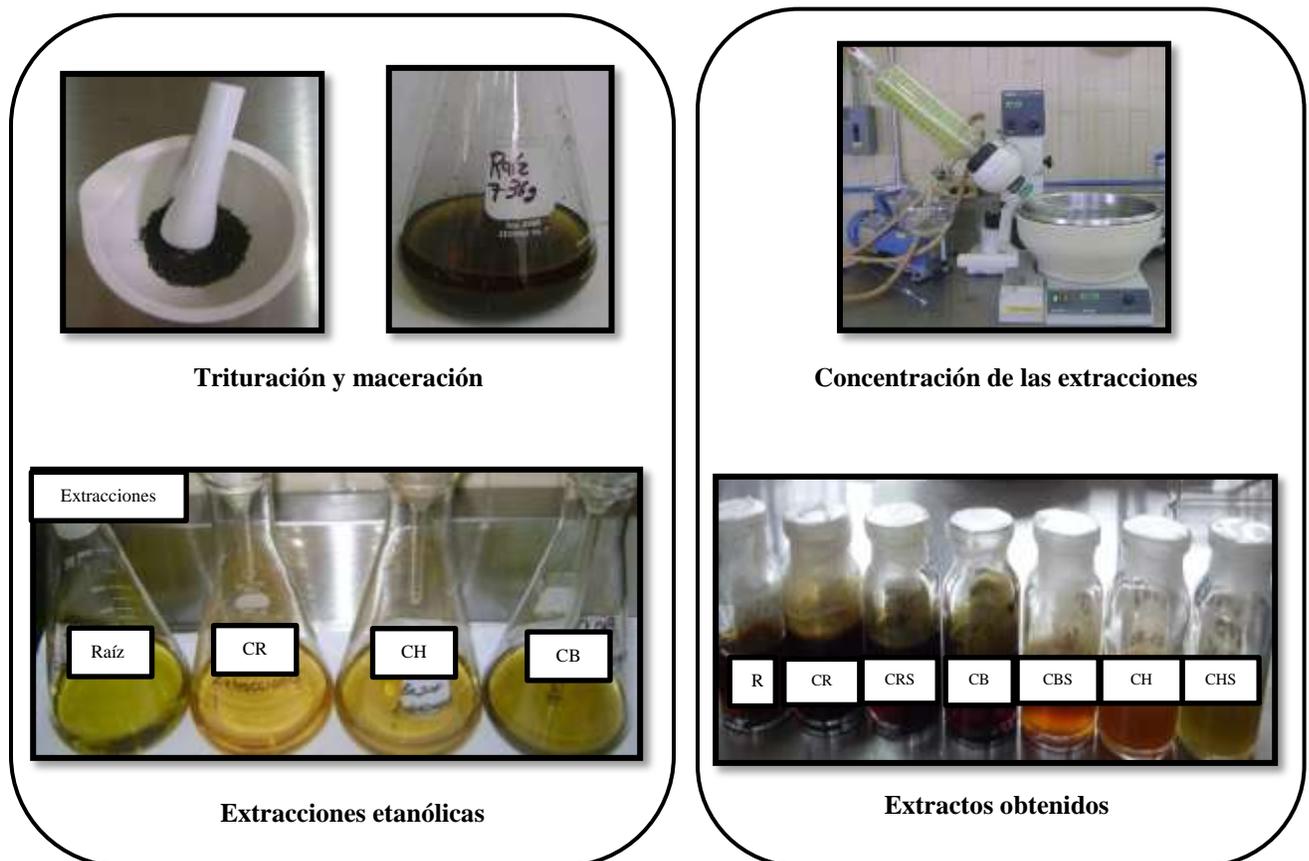


Figura 6. Procedimiento para la obtención de los diferentes extractos.

6.2.8 Identificación de alcaloides y flavonoides en el extracto acuoso y etanólico

Se emplearon placas de sílica gel en fase reversa (cromatofolios Merck®), las cuales fueron cortadas de 5 cm de alto por 4 cm de ancho, se marcaron con puntos los lugares donde se aplicaron las muestras, dejando una distancia hacia el borde inferior de 1 cm; se colocaron pequeñas gotas de los diferentes extractos con ayuda de capilares. La placa se llevó a calentamiento en parrilla por 5 s para secar las muestras. La fase móvil utilizada fue cloroformo:acetona ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$), en una proporción de 95:5 respectivamente. Para observar la eficiencia de las fases, se corrieron algunas placas para ver la separación de los extractos y de esta forma hacer los ajustes correspondientes, y finalmente escoger dicha proporción de disolventes. Las placas fueron sometidas en este sistema de elución por 2 min aproximadamente hasta que el disolvente migró hacia la parte superior, a través del sorbente.

Para revelar el grupo de alcaloides presentes en las muestras se utilizó el ácido fosfomolibdico, con el cual estas sustancias revelan en color azul y el 4-hidroxibenzaldehído, con el que revelan en color morado, el cual fue preparado mezclando 0.5 mg de 4-hidroxibenzaldehído (Merck), 10 ml de ácido sulfúrico y 90 ml de etanol (Wagner, 1996). Para evidenciar la presencia de flavonoides se utilizó un compuesto específico llamado 2-aminoetil difenilborinato (1% en metanol), que indican la presencia de estos compuestos con coloraciones que van de amarillo a naranjas brillantes. Después de aplicar los reveladores con ayuda de un hisopo, las placas se colocaron en una parrilla a 150 °C durante 5-10 s y nuevamente se observaron en la cámara de UV (Santana, 2011) con una longitud de onda larga (360 nm) y corta (254 nm), dentro de este intervalo revela la presencia de alcaloides y flavonoides, ya que estos contienen anillos aromáticos que presentan resonancia magnética. Al pasar la luz UV a través de ellos presentan coloraciones oscuras, azules, naranjas o amarillas dependiendo del tipo de compuesto (Martínez, 2005).

6.2.9 Evaluación de la actividad antiinflamatoria y ansiolítica

6.2.9.1 Diseño experimental

Todos los roedores se acondicionaron por lo menos dos semanas antes de la experimentación en un bioterio a una temperatura de 25 °C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h, con acceso libre al agua y alimento. Durante la experimentación, los ratones fueron trasladados a

un laboratorio sono-amortiguado, a una temperatura de 25 °C con luz roja de 15W, se evitó usar perfumes y loción, también se permaneció en silencio. Se formaron grupos de 7 ratones para los modelos de CA, CO y para la prueba de Potenciación de barbitúricos y de 5 para la de TPA. La administración oral de los diferentes tratamientos se realizó, mediante el uso de una cánula metálica, siguiendo el esquema de administración mostrado en la **Tabla 3**.

El control positivo de las pruebas de actividad de SNC, fue el diacepam (DZP) y para la prueba de actividad antiinflamatoria fue la dexametasona (DEX). Los tratamientos evaluados fueron: extracto acuoso de raíz (EAR), extracto etanólico de raíz (EER), extracto etanólico de callo de raíz (EECR) y extracto acuoso de callo de raíz (EACR). El extracto etanólico de cada muestra vegetal fue disuelto en una solución al 1 % de Tween 20, este vehículo también sirvió como grupo control negativo (Vehículo-VEH). El extracto acuoso de las muestras fue disuelto en agua. El tratamiento que provocó el mejor efecto ansiolítico, se evaluó a diferentes dosis (50, 100 y 200 mg/kg) para la construcción de una curva dosis-respuesta.

Tabla 3. Tratamientos usados en las pruebas farmacológicas.

Actividad farmacológica	Prueba	Tratamientos	Dosis	Esquema de administración	Vía de administración
Anti-inflamatoria	Inflamación inducida por TPA	RE, CRE, DEXM,	200mg/kg	Inmediato a la prueba	Tópica
		RA, CRA,	200mg/kg	48, 24, 12 h y 30 minutos antes de la prueba	Oral
		DEXM	1.0 mg/kg	30 minutos antes de la prueba	Intraperitoneal (ip)
Sobre SNC	1. Potenciación de barbitúricos	RA, CRA, TWEEN 20 al 1%,	200mg/kg	48, 24, 12 h y 30 minutos antes de la prueba	Oral
	2. Claro-Oscuro	CRE	200mg/kg 100mg/kg 50mg/kg	48, 24, 12 h y 1 hr antes de la prueba	Oral
	3. Campo Abierto	DZP	1.0mg/kg	30 minutos antes de la prueba	Intraperitoneal (ip)

6.2.9.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria mediante la prueba de:

Inducción de inflamación por TPA

Después de marcar y pesar a los ratones, éstos fueron anestesiados con pentobarbital sódico a una dosis de 55 mg/kg, vía ip, en estado hipnótico se les administró en la oreja derecha 10 μ l de etanol al 70% tanto interna como externamente (control de manipulación), en la oreja izquierda se aplicaron los tratamientos correspondientes: 10 μ l en la parte interna y otra cantidad igual en la parte externa y 15 minutos después el inductor de inflamación (TPA), transcurridas 4 horas, los roedores fueron sacrificados en una cámara de gases, para posteriormente perforar cada una de las orejas y obtener segmentos circulares de 6 mm de diámetro del pabellón auricular, las secciones recortadas se pesaron inmediatamente, para determinar por la diferencia de peso entre ambas orejas, la actividad antiinflamatoria (Nakadate, 1989 y Pérez *et al.*, 2001).

6.2.9.3 Evaluación del efecto ansiolítico mediante la prueba de exploración Claro-

Oscuro

Se colocó al ratón en el centro del compartimiento iluminado, con la cara hacia la abertura, se midió la actividad de cada ratón durante 5 minutos de duración de la prueba (**Figura 7**) (Holmes *et al.*, 2001). Los parámetros registrados fueron:

1. El periodo de latencia que es el tiempo antes de dejar por primera vez el LC y pasar al LO.
2. El número de transiciones entre las dos áreas de la caja.
3. El tiempo que permaneció en cada lado.



Figura 7. Modelo de exploración Claro-Oscuro.

6.2.9.4 Evaluación del efecto sedante mediante la prueba de Campo Abierto

Se colocó al ratón en el centro de la caja de acrílico para determinar su patrón conductual y actividad exploratoria durante 5 minutos (**Figura 8**) (Prut y Belzung, 2003). Este dispositivo cuadrado, desconocido para el roedor, previene el escape por la implementación de paredes. Los parámetros evaluados fueron:

1. El número de cruces de líneas de cada cuadrante en el piso (estos se registraron solo cuando las cuatro patas de los ratones estaban completamente dentro del cuadro).
2. La frecuencia de estiramientos verticales (EV).

Los parámetros etológicos que se midieron fueron:

- a) Locomoción periférica. El número de veces que se ocupó un cuadro de la periferia (P).
- b) Número de veces que el roedor atravesó el centro (C).
- c) Número de veces que el ratón se alzó en dos patas (R).
- d) Esta prueba se realizó inmediatamente después de la prueba de claro-oscuro.

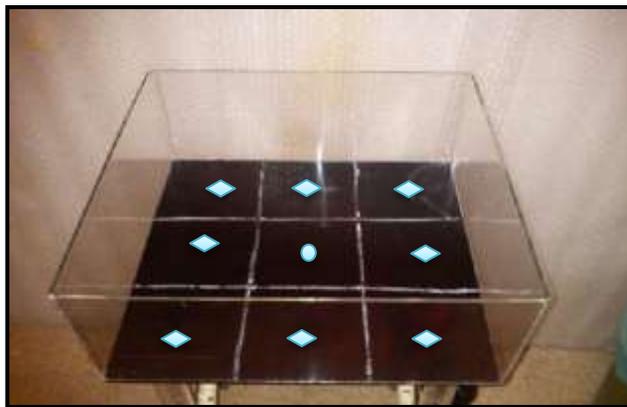


Figura 8. Modelo de Campo Abierto. Cuadro central (●), Cuadros de la periferia (◇)

6.2.9.5 Evaluación del efecto sedante (prueba de Potenciación de barbitúricos)

El efecto anestésico del pentobarbital se presenta a una dosis por arriba de 50 mg/kg para ratón. Esta prueba consistió en la administración previa (**Tabla 3**) de los diferentes tratamientos, a la aplicación del barbitúrico el cual fue a una dosis sub-efectiva de 40 mg/kg. Enseguida de la administración ip del pentobarbital los animales fueron colocados sobre cajas individuales, y con la ayuda de un cronómetro se midió:

1. La latencia (en segundos), registrada como el periodo de tiempo desde que se administra el fármaco y hasta que se observa la pérdida del reflejo de enderezamiento (inicio del estado hipnótico).
2. La duración de la hipnosis (en segundos), que es el periodo de tiempo a partir de la pérdida del reflejo de enderezamiento y hasta la recuperación de éste.

6.2.10 Análisis estadístico

- a) Los datos obtenidos fueron vertidos en una tabla, y se muestran mediante graficas de barras los parámetros más relevantes de cada prueba.
- b) Los datos se analizaron con un ANOVA de una vía, que permitió determinar diferencias significativas entre las medias poblacionales, con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0.05$); seguida de una prueba post-Bonferroni para comparaciones múltiples. El programa estadístico utilizado fue el spss versión 11.

La significancia estadística en todos los estudios se estableció respecto a los grupos de animales que recibieron el vehículo (control negativo), en la prueba de TPA fue agua y en las pruebas de evaluación de la actividad ansiolítica Tween 20 al 1%.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención del material vegetal

7.1.1 Inducción de brotes adventicios a partir de fragmentos de raíz de *E. purpurea*

Como se puede observar en la **Figura 9**, desde los 7 d hay formación de brotes pero es a los 35 d cuando esta especie logra el rendimiento más alto (95%); después se estabiliza la respuesta. En un plazo de 45 d se registraron en promedio 3.42 brotes/explante (**Figura 10**), aunque existe la posibilidad de que el promedio fuera más elevado si se hubiera renovado el medio de cultivo a las 4 semanas, para descartar que el consumo de nutrientes afectara el número de brotes/explante inducidos. Con base en la prueba de ANOVA, estadísticamente existe diferencia significativa entre los tiempos de 7, 14, 21 y 28 d ($p < 0.5$). Mientras que entre los 28, 35 y 42 d no la hubo ($p > 0.05$), lo que indica que después de los 28 d ya no hay formación de brotes adventicios.

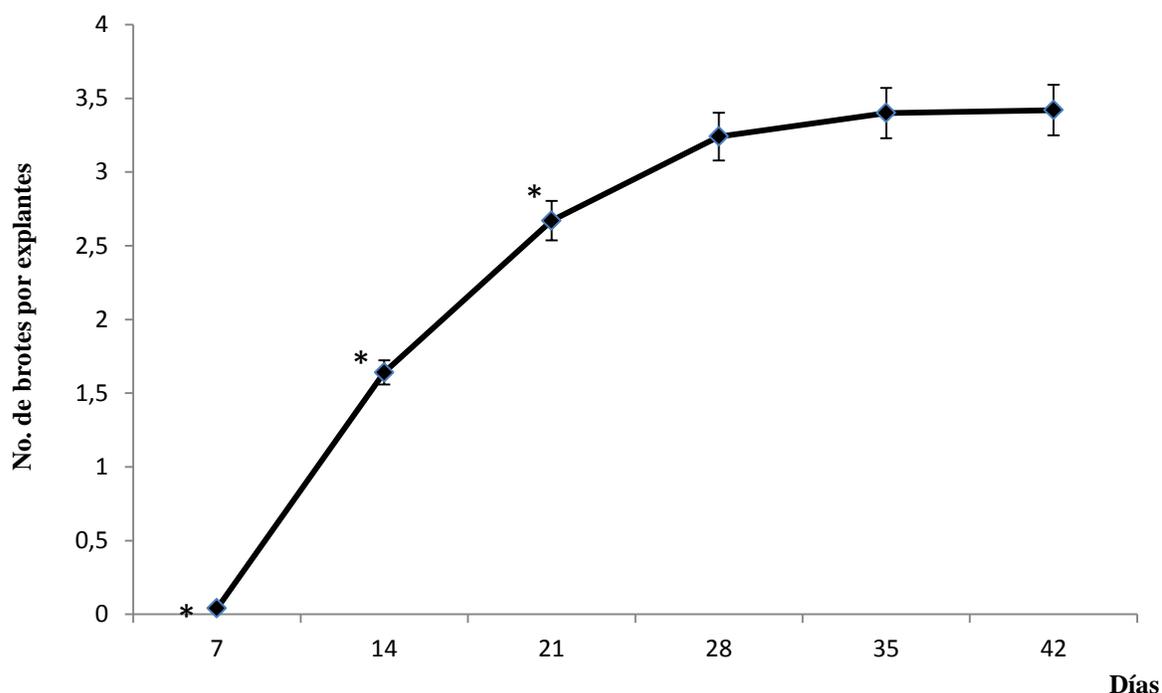


Figura 9. Evaluación de la inducción de brotes a partir de explantes de raíz de *E. purpurea*, con BAP (0.1 mg/l) a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días, n=100. ANOVA * $p < 0.05$.

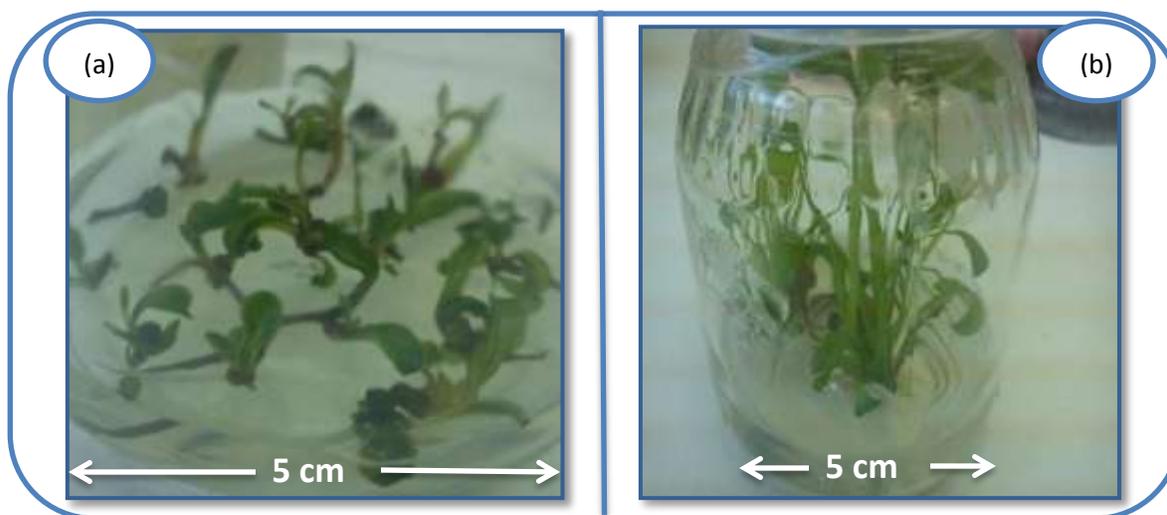


Figura 10. Imágenes fotográficas que muestran: a) Inducción de brotes de *E. purpurea* a los 14 días, b) El subcultivo de brotes de 42 días de edad en medio MS adicionado con BAP (0.1 mg/l).

Algunos autores indican que en ciertas especies, luego de un período de estabilización como el aquí observado, los brotes producidos aumentan su potencial de multiplicación, debido posiblemente a un fenómeno de adaptación de los tejidos al cultivo *in vitro*, también mencionan que muchos tejidos comienzan a producir sus propias citocininas en estas condiciones, lo que hace que se presente una mayor estimulación hacia la formación de brotes axilares y adventicios (Loaiza *et al.*, 2004). Por los resultados obtenidos es muy probable que *E. purpurea* presente esta respuesta de habituación, por mostrar este mismo comportamiento biológico.

Por otro lado los fragmentos que no formaron brotes (5 %), se alargaron creando un arco que finalmente se insertó en el medio nutritivo, la fracción superior que no tenía contacto con el medio formó pelos absorbentes (**Figura 11a**). El 100% de estos explantes de raíz presentaron la capacidad de regeneración de los tejidos internos y externos, de tal manera que a los 45 d de evaluación no se distinguía el lugar del corte, y además se formó una punta que mantuvo el geotropismo. Cuando los fragmentos alcanzaron una longitud de 4 cm (25 d de edad) presentaron una coloración café-marrón seguida de una punta blanca (**Figura 11b y c**). Cabe mencionar que la raíz de esta especie es en realidad un rizoma, lo cual explica su capacidad para regenerar brotes y os tejidos de respuesta a la gravedad (McKeown, 1999).

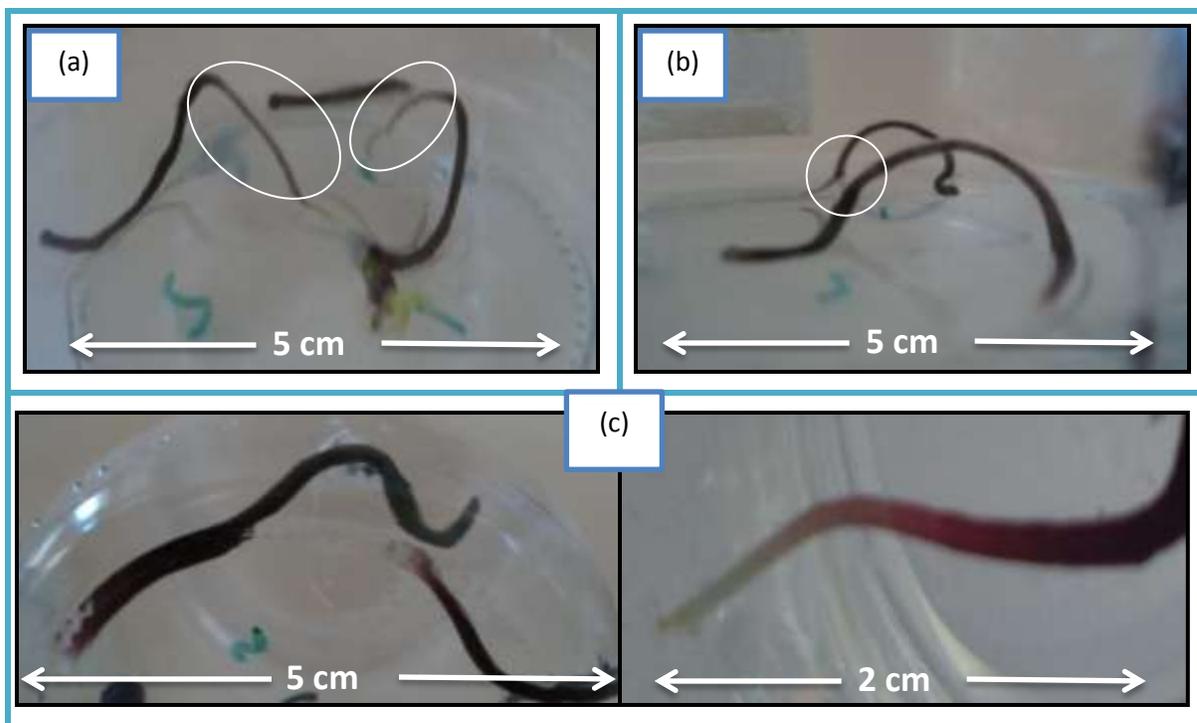


Figura 11. Imágenes fotográficas que muestran: (a) Pelos absorbentes, (b) Regeneración y alargamiento de la raíz, (c) Raíz de 4.0 cm con punta blanca seguida de una coloración rojo-marrón. Durante la evaluación de inducción de brotes a partir de fragmentos de raíz, con BAP (0.1 mg/l).

Comparando los resultados obtenidos, Gómez en el 2004, reportó que las condiciones óptimas para la inducción de brotes de *E. purpurea*, son MS al 100% con 0.5 mg/l de BAP, logrando 12 brotes por explante en un periodo de 6 semanas, utilizando brotes provenientes de la germinación de semillas. Santana en el 2011, logró obtener de 3-4 brotes adventicios por fragmento de raíz en MS al 100% adicionado con 0.1 mg/l de BAP, en un tiempo de 4 semanas. Harbaje en el 2001, utilizó semillas, puntas apicales y segmentos nodales para estimular la multiplicación de brotes utilizando benciladenina, logrando de 1-3 brotes por explante al término de 6 semanas.

En el presente trabajo, se obtuvo un rendimiento de 3.42 brotes/explante con 0.1 mg/l de BAP, el cual se consideraría bajo; sin embargo una alta tasa de multiplicación obtenida con un contenido bajo de citoquininas es muy deseable, como lo obtenido en el presente trabajo, ya que la tendencia actual en la propagación de plantas, es el empleo de medios de cultivo cada vez más simples. Los resultados obtenidos son un alternativa rápida para la micropropagación

de *E. purpurea*, sin la necesidad de utilizar brotes; únicamente fragmentos de raíz utilizando bajas concentraciones de RCV. Esto es relevante ya que se reducen los costos de obtención del material de propagación y a la vez se minimiza la variabilidad que se presenta durante el cultivo *in vitro* de esta especie.

7.1.2 Inducción de enraizamiento de brotes de *E. purpurea*

Los brotes de los tres diferentes tamaños comenzaron a vitrificarse desde los 7 d, finalmente los brotes de 1 y 2 cm de altura presentaron a los 42 d un porcentaje del 100% de vitrificación, y los brotes de 3 cm presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) con un 15% de vitrificación. Como una segunda respuesta observada fue la formación de callo, el inicio del desarrollo de la masa celular se presenció a los 21 d, al término de los 42 d se obtuvo un porcentaje del 100, 90 y 10% en los brotes de 1, 2 y 3 cm respectivamente; en los primeros dos no hubo diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), no así en los brotes de 3 cm ($p < 0.05$) (**Figura 12a y b**).

Con respecto a lo anterior se tienen antecedentes donde ANA es utilizado para incrementar el área de callos e inducir la formación de raíces en él, sin embargo estos resultados no son significativos en comparación con la cantidad de biomasa obtenida con 2,4-D, por lo que ANA es utilizado para la inducción de raíces y el 2,4-D para la formación de callos en *E. purpurea*. En el mismo estudio se reportó que las concentraciones mayores a 0,5 mg/l de ANA generaban vitrificación en el callo (Wayner, 2001).

Sin embargo todos los callos formados en la base del tallo, a pesar de estar en presencia de 0,5mg/l de ANA presentaron una coloración verde, el 100% fueron friables y presentaron un tamaño promedio de 1.0 cm de longitud por 0.7cm de altura (**Figura 13 a y b**), posteriormente se subcultivaron cada 21 d en el mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones ambientales (para posteriormente realizar su cinética de crecimiento y ser utilizados en las pruebas farmacológicas). No se presentaron problemas de vitrificación, por el contrario continuaron aumentando su volumen. Este crecimiento se debe a que ANA promueve la división celular (Wayner, 2001). Además se observó la tendencia del explante a formar la masa celular en la parte donde se realizó el corte (herida) con el bisturí, sin embargo los brotes de mayor tamaño fueron menos susceptibles a la formación de callogénesis. Con base en los

resultados obtenidos se observó una relación positiva entre enraizamiento y brotes de 3 cm sin herida. Esta misma respuesta fue observada por Loaiza en el 2004, durante la inducción de rizogénesis de brotes de esta misma especie. Esta tendencia se relaciona a la presencia de ANA, debido a que estimula la división del cambium (Slack, 2001); y al realizar el corte en la base de los brotes cuyo tallo es muy corto se expone este tejido, donde se está llevando a cabo una alta división celular, y al hacer contacto con el medio suplementado con ANA, se estimula la división celular.

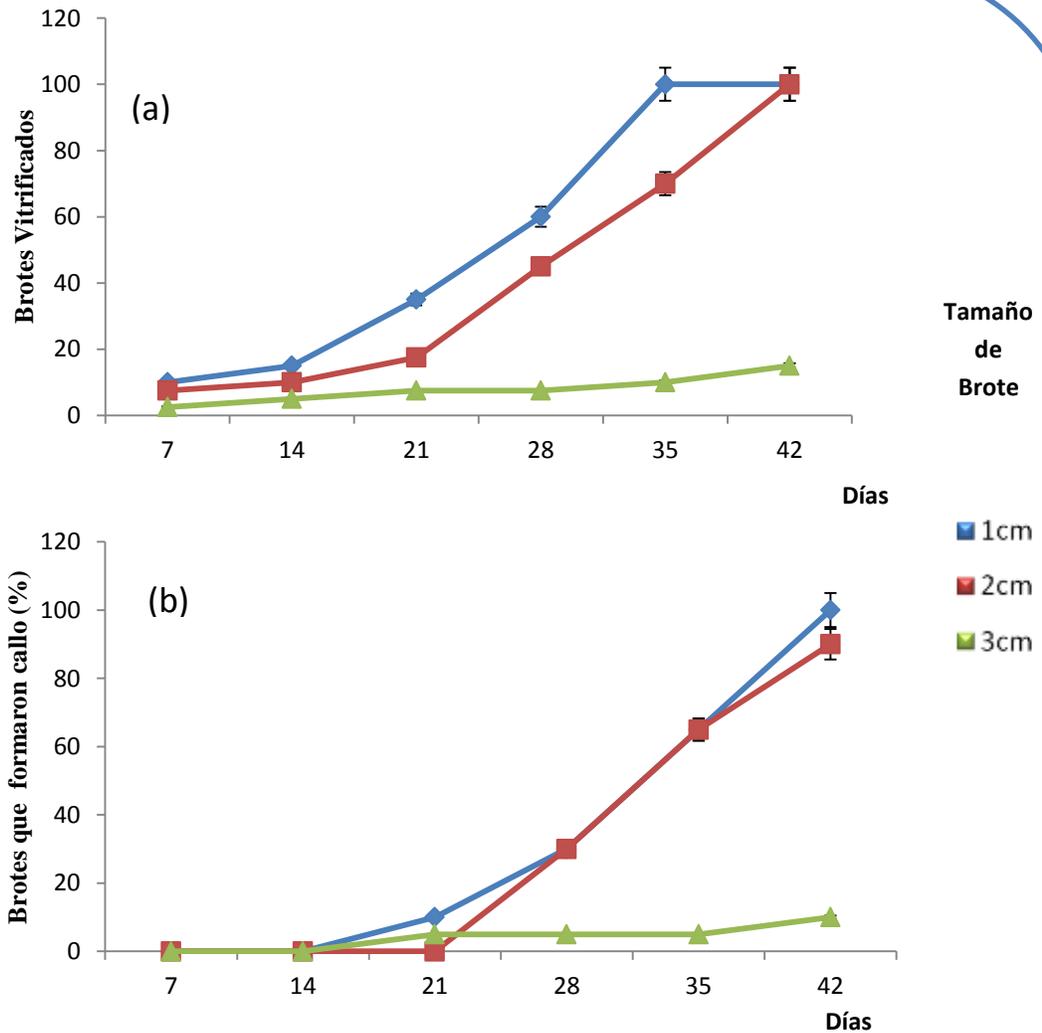


Figura 12. Respuestas evaluadas durante la inducción de rizogénesis en brotes de 1, 2 y 3 cm de altura con ANA (0.5 mg/l), evaluados por 6 semanas. a) Porcentajes de brotes vitrificados y b) Porcentaje de brotes que formaron callo, n=40. ANOVA, *p<0.05.

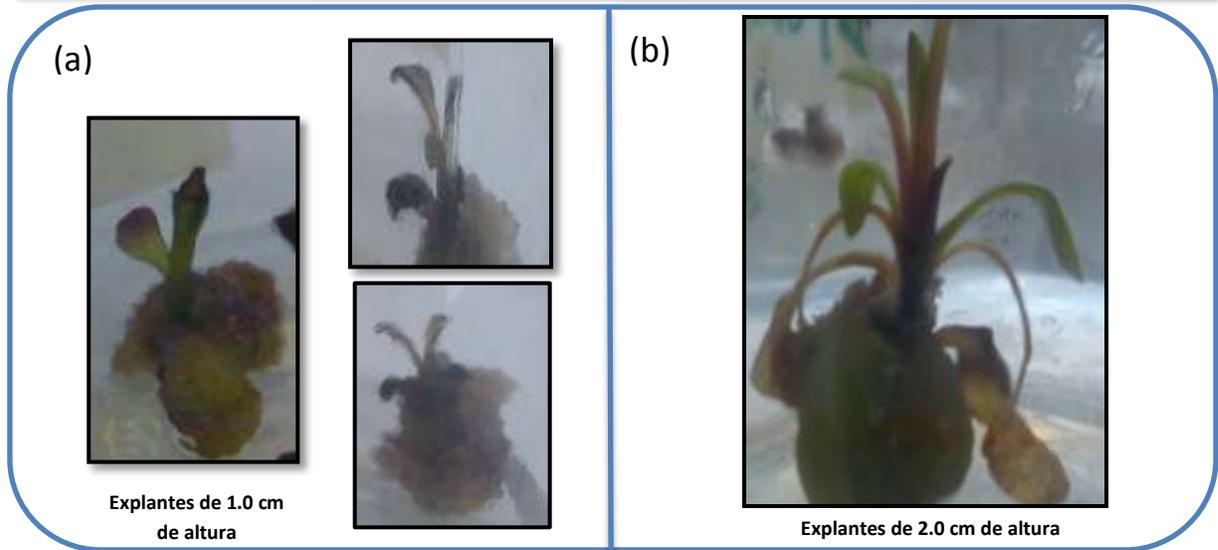


Figura 13. Imágenes fotográficas que muestran: a) Callos formados en la base del tallo, en brotes de 1.0 cm, b) Callo formado en la base del tallo en brote de 2.0 cm. Evaluación realizada a los 42 días.

En relación a la inducción de raíces, los brotes de mayor tamaño fueron los únicos donde se observó formación, presentándose de los 14 a los 21 d, posteriormente de los 28 a los 42 d el porcentaje de formación permaneció constante (7.5%) (**Figura 14**). Esto puede deberse a que la inducción se presenta en el primer periodo y en el segundo, los tejidos formados dirigen su metabolismo al crecimiento y desarrollo y no a la inducción de raíces. Estadísticamente existe diferencia significativa entre los 14 y los 21 d y entre los 21 y 28 d ($p < 0.05$), después de la cuarta semana de evaluación no hubo diferencia estadística significativa ($p > 0.05$).

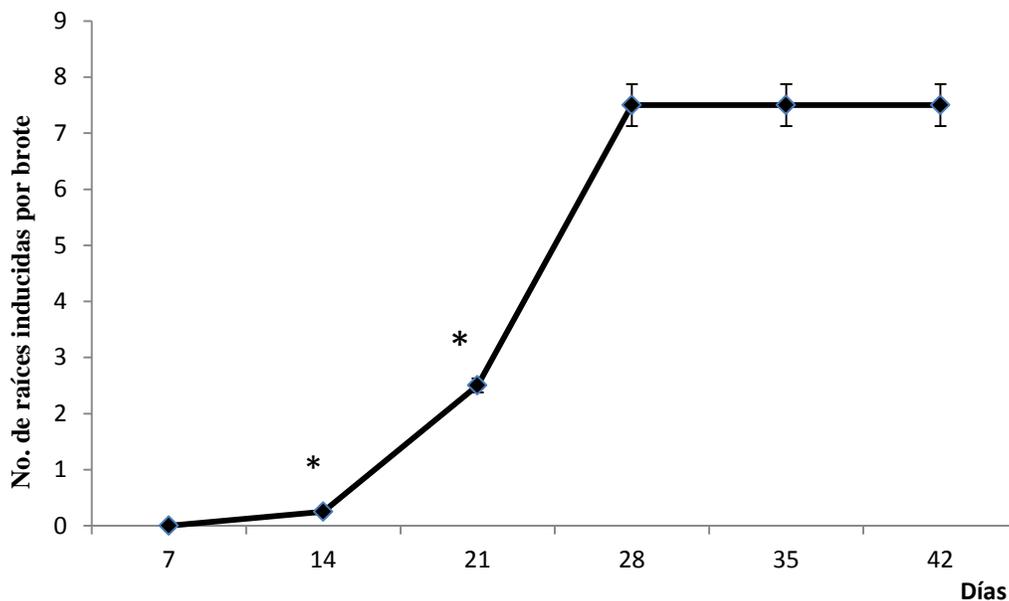


Figura 14. Raíces inducidas en brotes de 3cm de altura con ANA (0.5 mg/l), n=40. ANOVA, * $p < 0.05$.

Harbaje en el 2007 logró el enraizamiento de esta especie sin la utilización de RCV a las 6 semanas, sin embargo el sistema radicular fue muy delgado, frágil y escaso; Koroch en el 2002 obtuvo el mayor número de raíces (3.1 raíz por explante) y longitud lo obtuvo con IBA (0.49 μ Mol/L). Choffe en el 2004, obtuvo 6 y 5 raíces por explante de hipocótilo con 5 y 10 μ M/L de IBA y en explantes de cotiledón 9.7 raíces por explante con 50 y μ Mol/l de IBA, a los 28 días de subcultivo. Gómez en el 2004, a una concentración de 3 mg/l de AIA obtuvo un 90% de plántulas mayores a 2 cm con raíces de 3 cm.

Las diferencias observadas en los resultados anteriores se deben al tipo de explante utilizado para la inducción de raíces, puesto que la conformación estructural de los tejidos internos la concentración de los RCV (Palma, 1995), el tamaño y la edad del brote (Loaiza *et al.*, 2004); influyen en la respuesta de diferenciación celular. En el caso particular de esta especie fue decisivo si el brote fue cortado o separado del tejido proveniente, lo que influyó de manera determinante en la generación de callo.

Posterior a estos resultados se realizó una segunda evaluación, utilizando brotes de 3cm de altura de 5 semanas de edad, los cuales fueron separados de la plántula madre sin herir la base del tallo con el bisturí. Los resultados obtenidos son los siguientes: desde los 7 d hubo formación de raíces (2.7 raíces/brote), pero es hasta los 35 d cuando esta especie alcanza el mayor promedio: 14.5 raíces/brote (**Figura 15**), resultado similar al obtenido por Santana en el 2011, quien reporta 13.29 raíces/brote con ANA (0.5 mg/l). Estadísticamente existió diferencia significativa entre los 7, 14 d y entre los 14 y 21 ($p < 0.05$), a partir de los 28 d ya no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$).

La raíz principal presentó en promedio una longitud de 9.0 cm, una coloración marrón con punta blanca, misma que se observó en las raíces secundarias (**Figura 16**). En el presente trabajo el uso de la auxina ANA fue determinante para estimular la división y alargamiento celular para la inducción y el crecimiento de los tejidos de la raíz. El desarrollo de este órgano se favoreció por la presencia de este RCV.

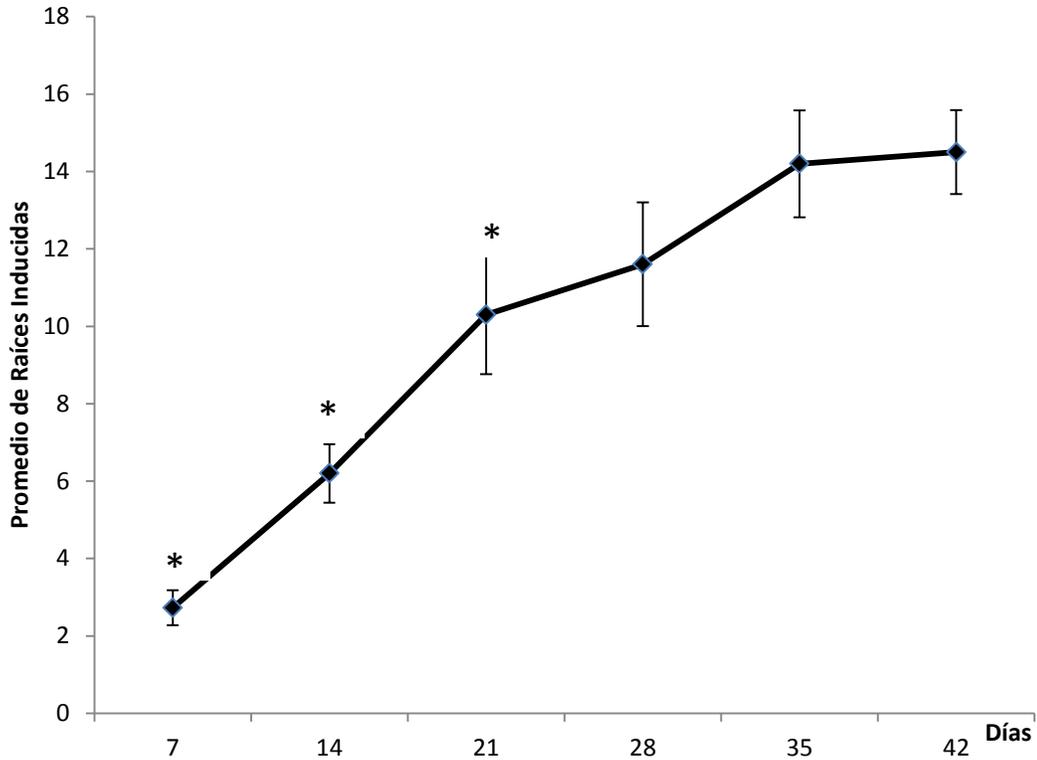


Figura 15. Número promedio de raíces inducidas por semana en brotes de 3 cm con ANA (0.5 mg/l) desprendidos de la planta madre, n=40. ANOVA, *p<0.05.



Figura 16. Imágenes que muestran el sistema radicular formado por brotes de 3 cm de altura y 6 semanas de edad, en medio MS adicionado con ANA (0.5 mg/l).

7.1.3 Inducción de callo a partir de raíz y hoja de *E. purpurea*

Resultados de la inducción de CR: En la **Tabla 4** se presentan en color morado los porcentajes de inducción de callos pequeños (0.6 cm de largo/ 0.1 cm de altura), en color verde se muestran los callos de tamaño mediano (0.7 cm de largo/ 0.2 cm de altura) y en color rosa los de tamaño grande (0.9 cm de largo/ 0.3 cm de altura), al término de los 42 d de evaluación. Los tratamientos M, N y Ñ indujeron en un 100% callos pequeños, el tratamiento que formó el mayor porcentaje de callos medianos fue el K. Los únicos tratamientos que formaron callos grandes fueron K y L; mientras que los tratamientos que no presentaron formación de la masa celular fueron E, O, T, W, 25% y 50%. Otras respuestas observadas fueron: el alargamiento del explante, destacando el tratamiento A y el MS al 25% presentando una longitud promedio de 1.3 y 2.5 cm respectivamente; la formación de raíces secundarias, siendo los tratamientos B y C los que mayor porcentaje presentaron con una longitud de 0.5cm.

Tabla 4: Respuestas observadas durante la evaluación de inducción de callogénesis en fragmentos de 0.5 cm de raíz de la especie *E. purpurea*.

Auxinas/2-4-D Tratamientos (mg/l)	Citocininas/KIN				
	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
0.00	A EE 77.77%	B FRS 77.77%	C FRS 66.66%	D	E FRS 44.44%
0.25	F	G 44.44%	H	I	J
0.50	K 88.88% 11.11%	L 100%	M 100%	N 100%	Ñ 100%
0.75	O	P	Q EE 44.44%	R	S
1.00	T	U EE 44.44%	V	W	X
MS al 25%	EE 100%				
MS al 50%	EE 11.11% y FRS 33.33%				

EE=elongación de explante, FRS= formación de raíces secundarias.

La mayoría de los callos presentaron una pigmentación café con excepción de los callos formados en los tratamientos K, L, M y Ñ que fueron de color café-marrón y los inducidos en los tratamientos I e J que presentaron color blanco. Cuando se realizó la segunda resiembra,

los callos blancos y cafés cambiaron su coloración a café-marrón (2 meses de edad), probablemente esto se relacione a un proceso de maduración del agregado celular y la producción de pigmentos en las células; sin embargo no existen antecedentes relacionados con el periodo en el cual las células inician la producción y acumulación de pigmentos en esta especie.

Resultados de la inducción de CH: Los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 5**, donde los tratamientos que mayor porcentaje de inducción de callo (en rosa) presentaron son: J, N, Ñ y S para el caso de pecíolo y M, N, Ñ, S y X para Lamina Foliar (LF), sin embargo fue el tratamiento Ñ el que indujo la formación de callo en un 100% en ambos fragmentos de hoja. Los tratamientos que obtuvieron el mayor porcentaje de necrosis (en morado) en pecíolo fueron A, B, C y W, y en LF los tratamientos U, W, B y C. En esta evaluación también se observó la formación de raíces, siendo el tratamiento de MS al 25% con un 30 % en explantes de LF, y los tratamientos del 25 y 50% en pecíolo. En cuanto al tamaño los callos presentaron un área de 0.7 cm de largo/0.2 cm de alto (en promedio). El 100% de los callos formados en los diferentes tratamientos fueron incoloros (**Figura 17a**).

Tabla 5: Respuestas observadas durante la evaluación de inducción de calogénesis en fragmentos de 0.5 cm de pecíolo y lamina foliar de la especie *E. purpurea*.

Auxinas/2-4-D	Citocininas/KIN				
Tratamientos (mg/l)	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00
0.00	A	B	C	D	E
	P 100% LF 51.66%	P 100% LF 93.33%	P 93.33% LF 91.66%		
0.25	F	G	H	I	J
					P 70%
0.50	K	L	M	N	Ñ
	P 83.33 % LF 88.88%		LF 66.66 %	P 75.55% LF 91.66%	P 100% LF 100%
0.75	O	P	Q	R	S
					P 83.33% LF 47.22%
1.00	T	U	V	W	X
		LF 100%		P 100% LF 100%	LF 48.88%
MS al 25%	FRS (28.33%) en pecíolo y FRS (25%) en lamina foliar.				
MS al 50%	FRS (16.66%) en pecíolo.				

P= pecíolo, LF= lamina foliar, FRS= formación de raíces

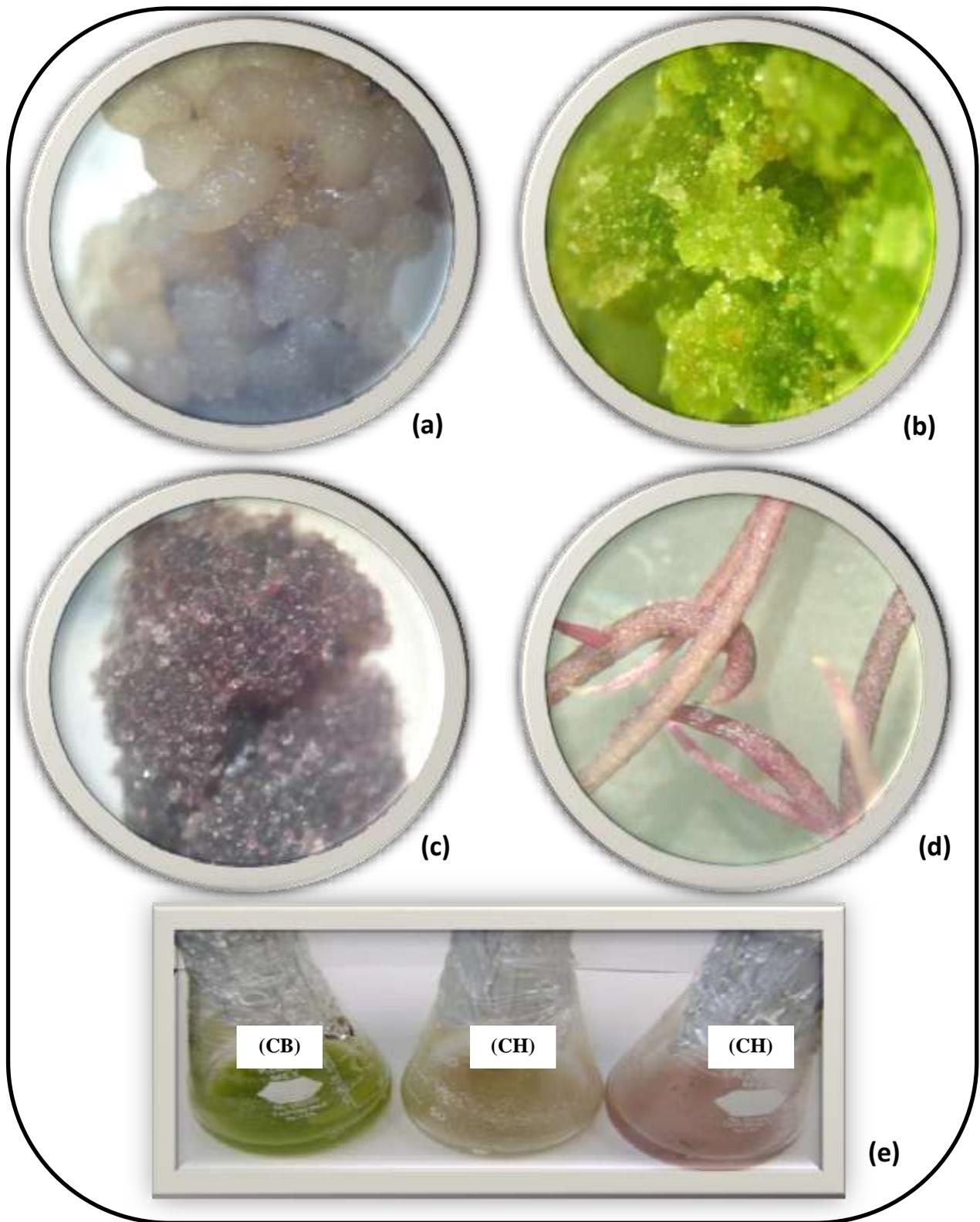


Figura 17. Imágenes fotográficas que muestran durante su fase exponencial al: a) Callo de Hoja, b) Callo de Base del Tallo, c) Callo de Raíz, en una escala de 40x, d) Raíces (20x) y e) Cultivo en suspensión de las tres líneas de callo.

Con base en la información registrada de investigaciones recientes, se ha determinado que la presencia de una auxina para la iniciación de un callo en esta especie es necesaria; y que generalmente se emplea el 2,4-D (Halperin, 1996). También se reportan que la formación de callo se puede obtener a partir de explantes en medios que contengan una proporción alta de auxina-citocinina (Rocca *et al.*, 1997). Sin embargo, en *E. purpurea* la presencia del 2,4-D en combinación con KIN en concentraciones relativamente bajas, mostró ser eficiente para la formación y desarrollo del callo proveniente de fracciones de raíz (0.5 mg/ de 2,4-D y 0.25 mg/l de KIN), no así con los CH (0.5 2,4-D y 1.0 mg/l de KIN).

En cuanto a la coloración existen reportes en otras especies, que confirman que durante la inducción de callos siempre existe variación somaclonal, la cual es atribuida a factores ambientales. Esta variación puede reflejarse en cambios en los patrones enzimáticos, la producción y la calidad de metabolitos secundarios, y en la resistencia a factores abióticos (Loaiza *et al.*, 2004). Sin embargo en *E. purpurea* no se encontraron antecedentes, lo cual representa una oportunidad para realizar estudios morfológicos e histológicos con el fin de identificar los órganos de síntesis y acumulación de pigmentos y de metabolitos secundarios.

Con respecto al medio de cultivo, los resultados indicaron que de las 3 concentraciones de sales evaluadas (100, 50 y 25 %), la concentración de 100% favoreció la formación de callo, mientras que la elongación y formación de raíces secundarias se estimula cuando se sometieron los explantes al medio al 25 y 50%. Este resultado es concordante con las observaciones de Harbage (2001) quien encontró que el mejor desarrollo de las raíces de *E. purpúrea*, ocurre cuando se utiliza las sales del medio a la mitad de la concentración original, no obstante el cultivo *in vitro* de esta especie ha tenido éxito utilizándolas al 100%.

El fotoperíodo al cual se sometieron los callos, también influyó en su inducción, desarrollo y crecimiento; efecto estudiado con anterioridad (Lu *et al.*, 1982), donde se ha observado que un período de solo oscuridad induce el desarrollo de embriones somáticos y en menor grado se forman brotes (Wayner, 2001), fenómenos no observados en el presente trabajo en ninguna de las tres líneas celulares. Estos resultados nos muestran que la organización celular depende de las interacciones cuantitativas entre los reguladores de crecimiento y factores ambientales.

7.2 Cinéticas de crecimiento

El crecimiento determinado por el IC en función del peso seco, mostró un comportamiento lineal únicamente hasta la tercera semana de evaluación alcanzando un IC de 3.2 en CB, 1.6 en CH y 1.9 en CR. En las tres líneas celulares se observó que de 0 a 7 d se presenta la fase Lag y de 7 a 21 d la fase exponencial (siendo la tercera semana donde el IC alcanza el valor máximo). En la cuarta semana se observó una disminución del crecimiento, lo cual puede ser atribuido a una reducción del volumen celular, a la muerte de las células al agotarse los nutrientes del medio o por la formación de productos tóxicos. Con relación a lo anterior a los 21 d se presentó el inicio de un vire de color del medio nutritivo a un color café oscuro, lo que sugiere la oxidación del callo y la posible excreción al medio de compuestos fenólicos, los cuales han sido previamente reportados en estudios anteriores (Wayner, 2001 y Loaiza *et al.*, 2004).

Con base en los datos obtenidos los cuales no presentaron variaciones significativas entre las diferentes repeticiones realizadas, permite establecer el periodo óptimo para la realización de los subcultivos; el cual se encuentra en la tercera semana (**Figura 18, 19 y 20**). Sin embargo de las tres líneas de callos, son los CR los que presentaron la velocidad de crecimiento mayor (0.4086 d^{-1}) y el menor tiempo de duplicación (1.69 d) (**Tabla 6**). Estos resultados demuestran la viabilidad del establecimiento del cultivo en suspensión utilizando los callos obtenidos en el presente trabajo. Lo cual permitiría poder comparar los rendimientos de biomasa y extractos en cada cultivo.

Tabla 6: Parámetros cinéticos de las tres líneas de callos.

Parámetros cinéticos	CB	CH	CR
$\mu=$	0.1088 d^{-1}	0.1177 d^{-1}	0.4086 d^{-1}
TD=	6.37 d	5.88 d	1.69 d

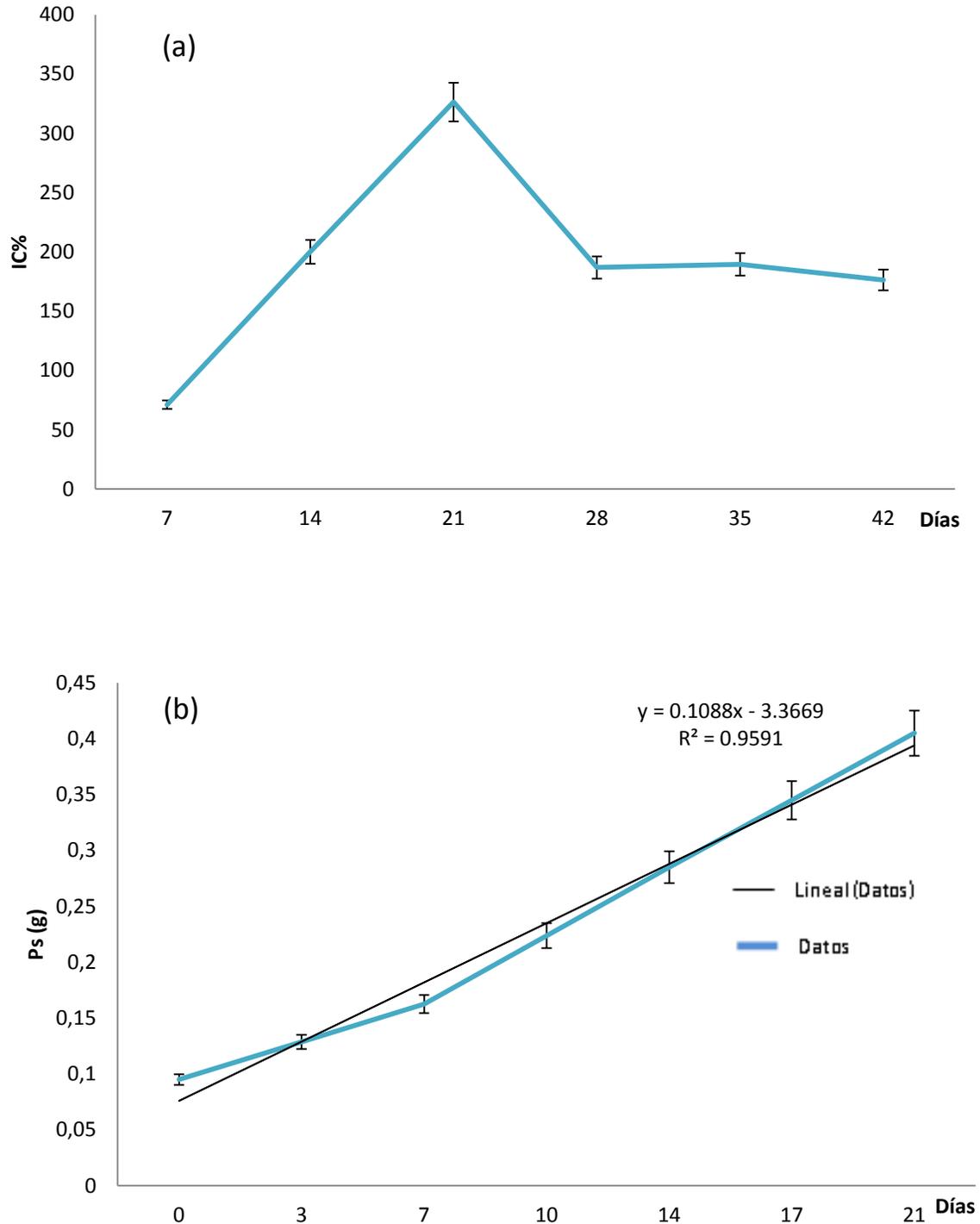
Callos de Base del tallo

Figura 18. Cinética de crecimiento del CB de *E. purpurea* en respuesta a 0.5 mg/l de ANA. a) Índice de crecimiento, b) Crecimiento en peso seco. Evaluación realizada durante 6 semanas.

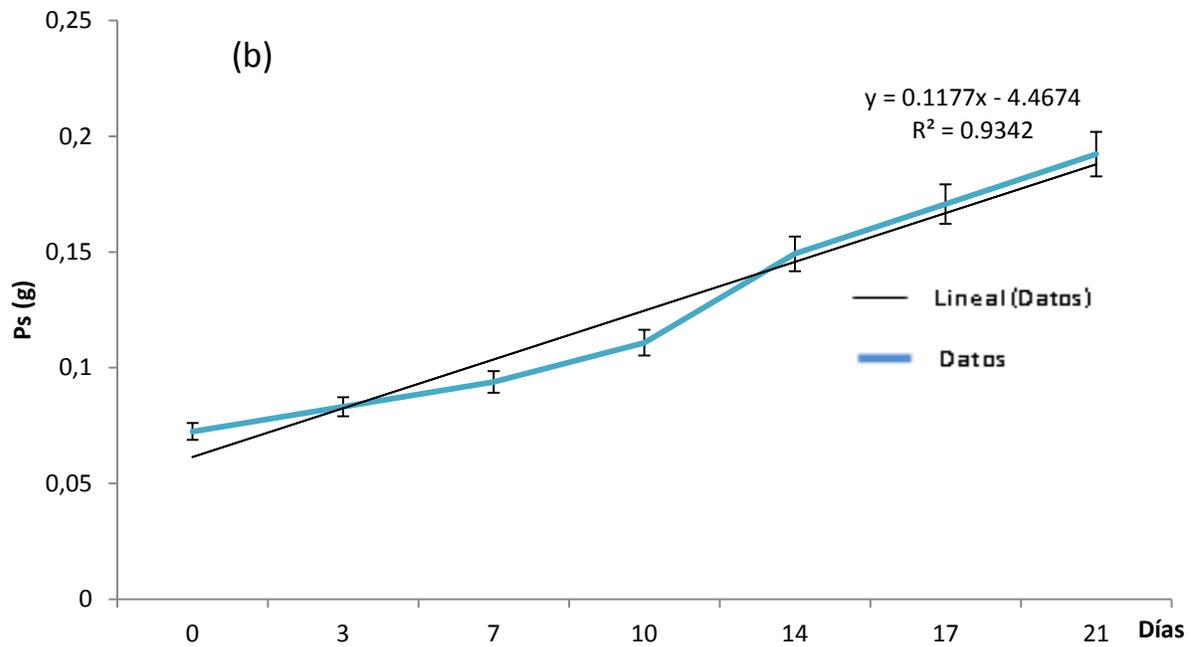
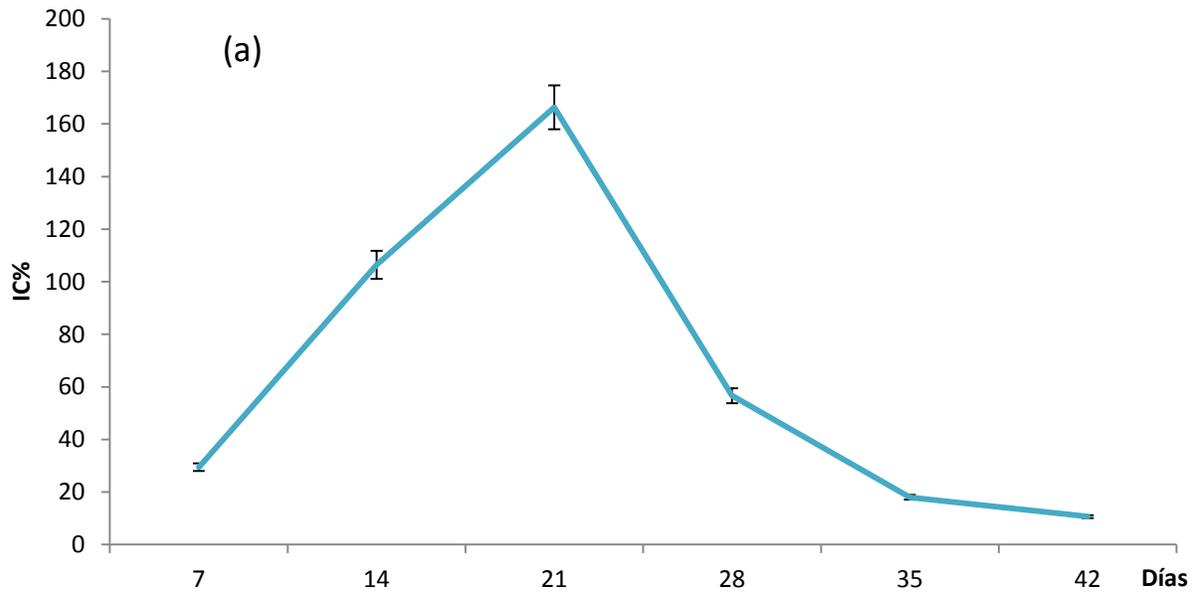
Callos de Hoja

Figura 19. Cinética de crecimiento del CH de *E. purpurea* en respuesta a 0.5 mg/l de 2, 4-D y 1.0 mg/l de KIN, en 6 semanas de evaluación. a) Índice de crecimiento, b) Crecimiento en peso seco. Evaluación realizada durante 6 semanas.

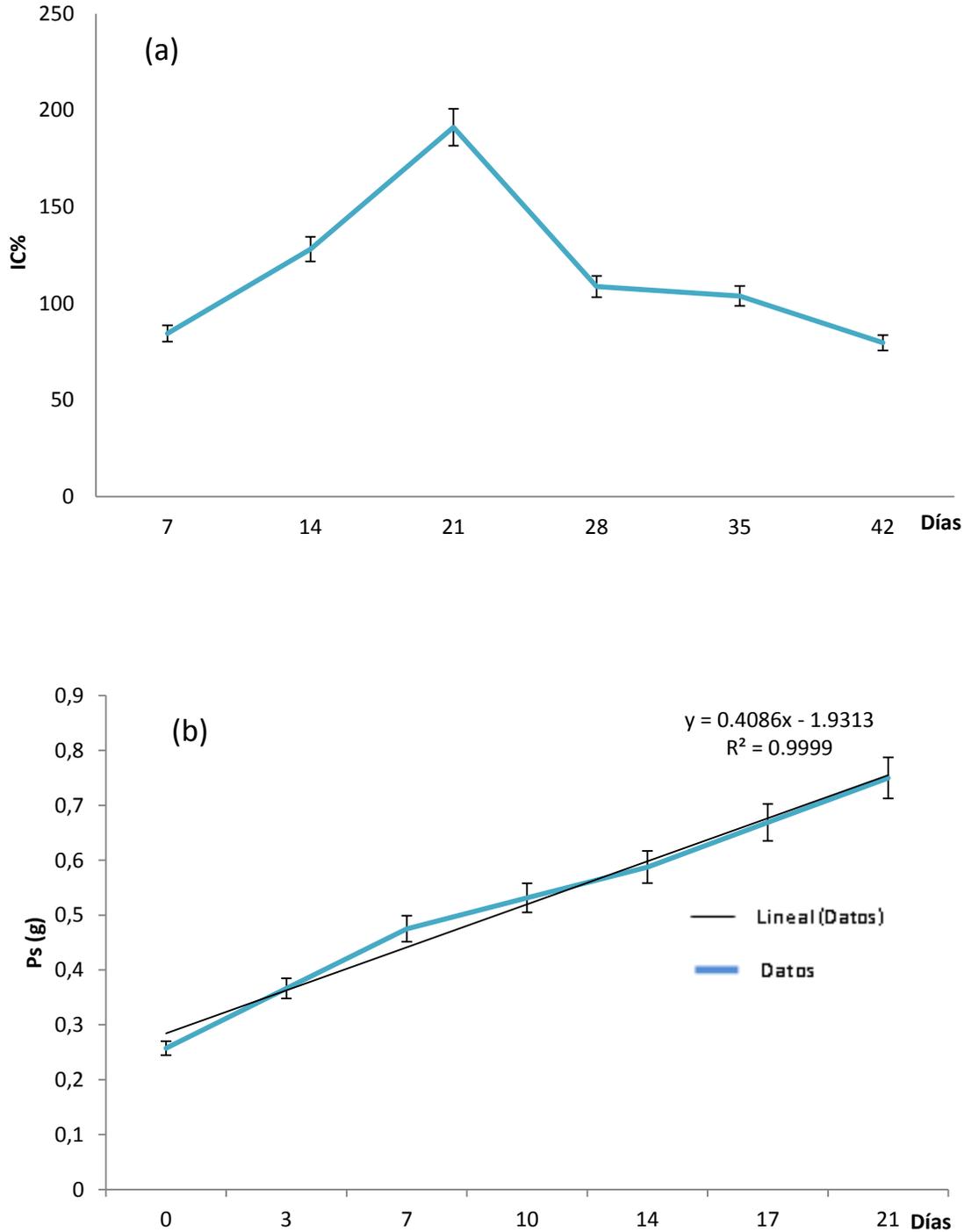
Callos de Raíz

Figura 20. Cinética de crecimiento del CR de *E. purpurea* en respuesta a 0.5 mg/l de 2, 4-D y 0.25 mg/l de KIN, en 6 semanas de evaluación. a) Índice de crecimiento, b) Crecimiento en peso seco. Evaluación realizada durante 6 semanas.

7.3 Obtención de los extractos e identificación de alcaloides y flavonoides

Determinación de los porcentajes de humedad: La raíz presentó el mayor rendimiento de biomasa debido a que un tejido tiene menor humedad que la contenida en un callo (Slack, 2001). De las líneas de callos el mayor rendimiento lo presentó CR con un 10.0%, y de los cultivos en suspensión, el proveniente de callo de raíz (CRS) con 9.0%. De las 3 líneas de callos la que mayor rendimiento de extractos acuoso y etanólicos presentó fue CR, y de los cultivos en suspensión, CBS en extracto etanólico y CRS en acuoso (**Tabla 7**).

Las 3 líneas de cultivo en suspensión presentaron menor rendimiento que las líneas de callo, sin embargo resta mucho por realizarse en los cultivos en suspensión como por ejemplo las cinéticas de crecimiento para poder comparar los IC, μ y el Td, con los obtenidos en las líneas de callos. Sin embargo para fines del presente trabajo no fue necesario.

Tabla 7. Rendimientos y porcentajes de humedad de las diferentes líneas celulares de *E. purpurea*.

Tratamientos	Rendimiento de biomasa seca (%)	Humedad (%)	Rendimiento de los extractos (%)	
			etanólicos	acuoso
CB	9.50±0.05	90.50	11.95±0.05	31.23
CH	7.00±0.05	93.00	11.96±0.05	35.90
CR	10.0±0.05	90.00	12.22±0.05	36.44
CBS	8.00±0.05	91.1	8.77±0.05	31.28
CHS	6.80±0.05	93.2	3.24±0.05	32.49
CRS	9.00±0.05	91.0	5.05±0.05	34.66
Raíz	17.5±0.05	82.5	11.89±0.05	39.40

Promedios ±DE (desviación estándar)

Identificación de alcaloides y flavonoides: En los extractos acuosos no se evidenció la presencia de alcaloides o flavonoides, pero en los extractos etanólicos ambos grupos fueron revelados, mostrándose un perfil cromatográfico similar entre los extractos de las diferentes líneas celulares (**Figura 21 y 22**). Por lo cual se calcularon únicamente los Rf que más destacaron, debido a que la gran cantidad de bandas (en el caso del grupo de alcaloides) dificultó el cálculo para cada una de ellas.

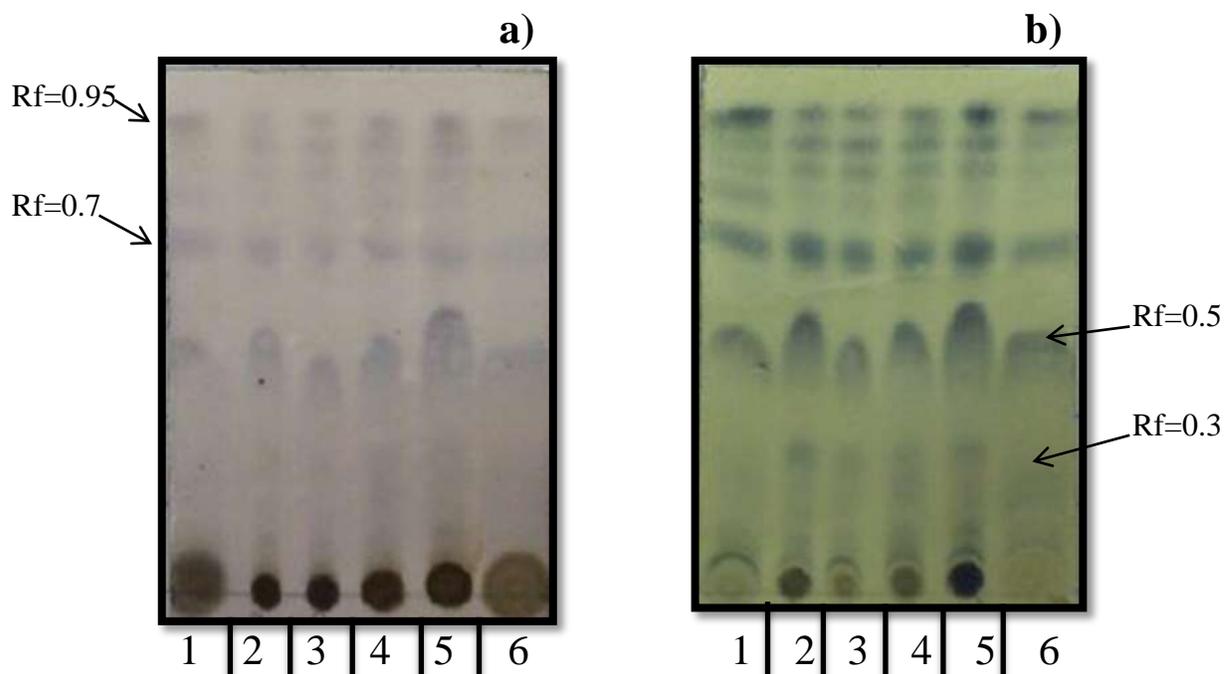


Figura 21. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de raíz y de callos de *E. purpurea*. a) Placa revelada con ácido fosfomolibdico y b) Placa revelada con 4-hidroxibenzaldehido. 1= Extracto de raíz, 2= extracto de callo de raíz, 3= extracto de callo de raíz en suspensión, 4= extracto de callo de base, 5= extracto de callo de base en suspensión, 6= extracto de callo de hoja.

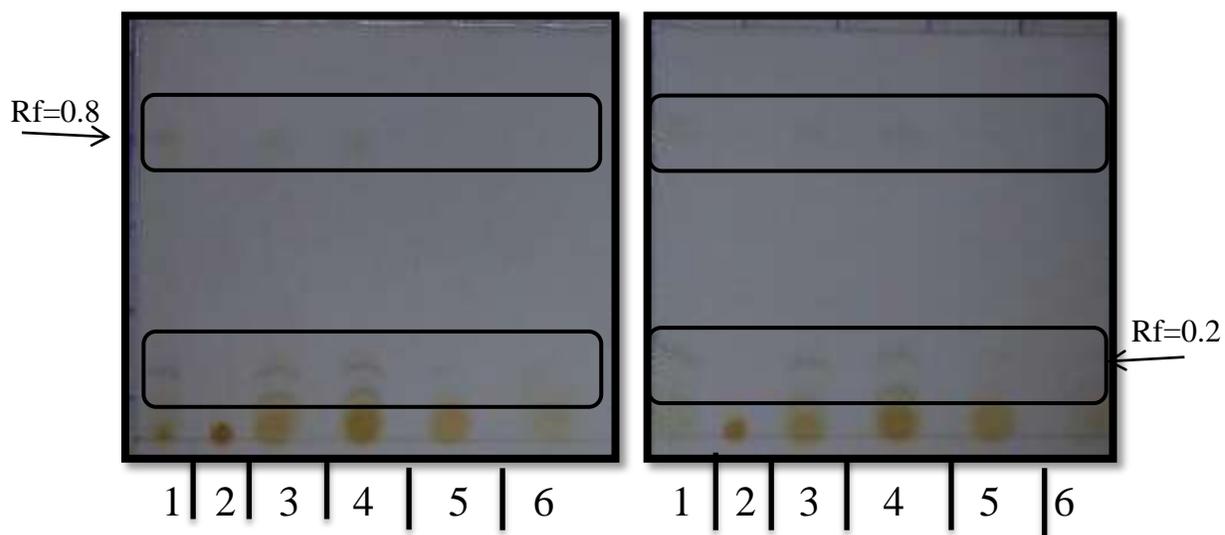


Figura 22. Cromatografía en capa fina de extractos etanólicos de raíz y de callos de *E. purpurea*. a) Placas reveladas con 2-aminoetil difenilborinato (1% en metanol). 1= Extracto de raíz, 2= extracto de callo de raíz, 3= extracto de callo de raíz en suspensión, 4= extracto de callo de base, 5= extracto de callo de base en suspensión, 6= extracto de callo de hoja.

Con respecto a los resultados anteriores se reporta que en esta especie se han identificado estos dos grupos como compuestos mayoritarios en la raíz, pero también se han identificado, un que en menor concentración en otros órganos como hoja (Ortega *et al.*, 2005). En el presente trabajo ambos grupos se hicieron presentes en los extractos etanólicos de los distintos callos. Lo que sugiere que estos metabolitos secundarios son constitutivos y no particulares de un órgano específico de la planta, no obstante existe a posibilidad de que estos se acumulen en la raíz, lo cual depende de las necesidades de la planta por utilizarlos.

De los compuestos que se han aislado e identificado en toda la planta se encontraron: la equinacina, el ácido cafeíco, ácido clorogénico, esteres del ácido cafeíco (equinacósidos A y B, cinarina, ácido cichórico), trazas de alcaloides pirrolizidínicos (tusilagina, isotusilagina), alcanidas e isobutilamidas y polisacáridos (Loaiza *et al.*, 2004).

En el caso del ácido cafeíco, que proviene de los fenilpropanoides, debido a su fitotoxicidad, por lo común son almacenados en las vacuolas o bien pueden conjugarse con otros componentes de la pared celular, proporcionándole refuerzo como respuesta de la planta a heridas causadas por ataques de patógenos o daño mecánico (Edwards y Gatehouse, 1999).

Se encontraron antecedentes que indican que los flavonoides, son utilizados por las plantas para limitar la invasión de microorganismos patógenos y también algunos son antioxidantes capaces de consumir el H₂O₂ y contribuir con el ajuste del estado de óxido-reducción celular desencadenado durante el estrés (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Debido a la gran cantidad de compuestos aislados de *E. purpurea*, restaría la identificación y cuantificación de los constituyentes de los extractos obtenidos a partir de callo, sin embargo para fines del presente estudio no se realizó.

7.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria y ansiolítica

7.4.1 Evaluación de la actividad antiinflamatoria (mediante TPA)

En esta prueba todos los tratamientos de extracto etanólico provenientes de *E. purpurea*, fueron administrados a los ratones vía oral a una dosis de 200 mg/kg, mientras que la administración del irritante TPA se realizó vía tópica. En la **Figura 23** se puede observar que el nivel de inflamación (medida como la diferencia de entre la oreja derecha e izquierda) en el grupo que recibió solo vehículo (VEH) fue de aproximadamente 0.012 g. En el grupo de animales que recibieron el antiinflamatorio dexametasona (DEXM) a una dosis de 1.0 mg/kg, mostraron una disminución del edema hasta un nivel de 0.0039 g dato que fue significativamente menor al grupo con vehículo ($p < 0.05$). Por otro lado, se puede observar que los tratamientos derivados de *E. purpurea* no disminuyen el edema causado por TPA, y los datos de estos grupos fueron estadísticamente igual que el grupo con vehículo ($p > 0.05$).

Posteriormente, se realizó un segundo ensayo con el extracto acuoso de los cultivos de callo, se puede observar en la **Figura 24**, los grupos de animales administrados con el extracto acuoso de raíz y callo, no indujeron cambios en la inflamación inducida por TPA, estadísticamente diferentes al de los animal, y el único grupo con una disminución significativa del edema fue el fármaco dexametasona ($p < 0.05$). Los resultados aquí mostrados, no concuerdan con algunos reportados en la literatura, por ejemplo en el 2002 se reporta que una dosis de 100 mg/kg de extracto etanólico de raíz, administrado vía oral disminuye el edema de planta inducido con carragenina, (Raso *et al.*, 2002).

Posterior a esto Vimalanathan *et al* en el 2009, mostró que el extracto acuoso de diferentes partes de *E. purpurea*, como raíces, hojas, tallos y en menor grado las flores, inducían un efecto de inhibición sobre la concentración de citocinas pro-inflamatorias IL-6 y IL-8 (CXCL-8) en un modelo de cultivo de células epiteliales bronquiales, infectadas con rinovirus tipo 14. Santana en el 2011 utilizando el extracto hidroalcohólico de raíces silvestres y plántulas cultivadas en hidroponía a una concentración de 320 mg/ml administradas localmente, provocaban una inhibición de la inflamación auricular inducido por carragenina en un 80.4 y 61.1% respectivamente. Esta diferencia entre los resultados en la literatura y los mostrados en este trabajo, indican que la planta posee propiedades antiinflamatorias, pero que su actividad

entonces va a depender del diseño experimental utilizado pero sobre todo del tipo de extracto analizado, lo cual resulta lógico en función de que la presencia de un determinado tipo de metabolito secundario va a estar sujeto al disolvente utilizado para su extracción y del material vegetal.

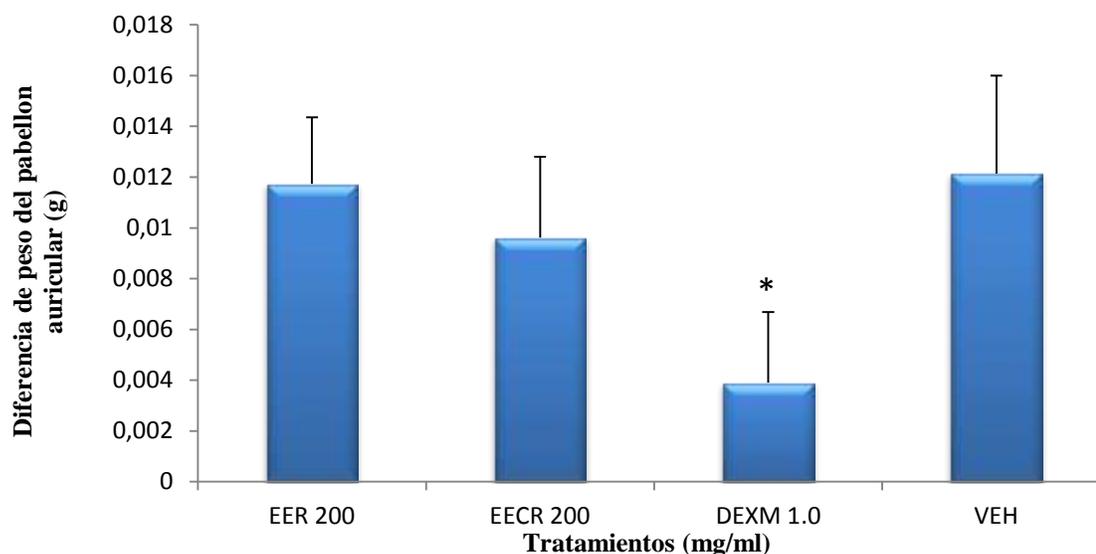


Figura 23. Evaluación del efecto antiinflamatorio de extractos de raíz y callos de *E. purpurea*, sobre el modelo de inducción por TPA. Administración tópica de 200 mg/kg de EER=Extracto etanólico de raíz, EECR= extracto etanólico de callo de raíz, DEXM= Dexametasona y vehículo= VEH. ANOVA, post-prueba Bonferroni * $p < 0.05$, $n = 5$.

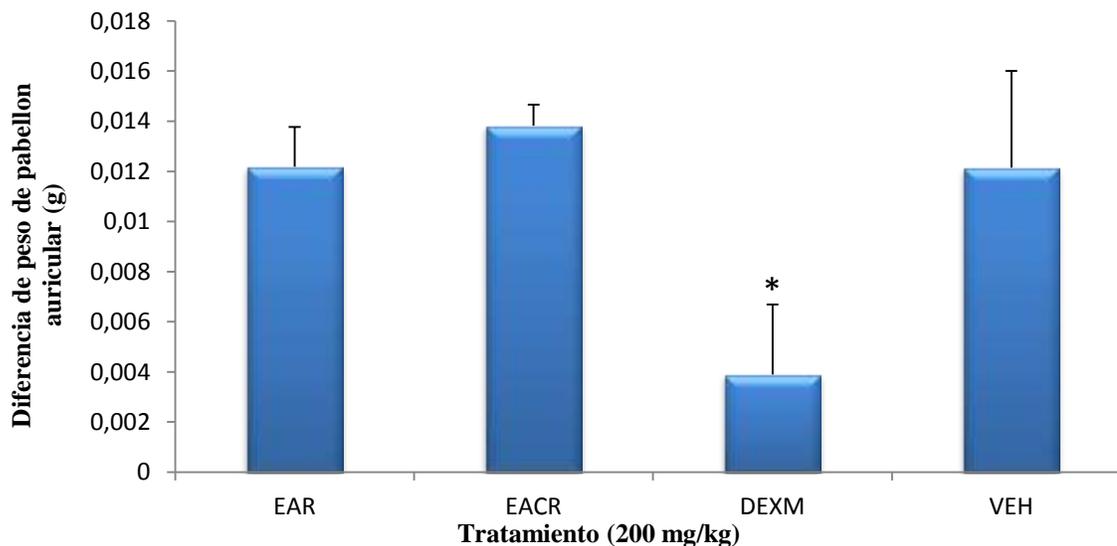


Figura 24. Evaluación del efecto antiinflamatorio de extractos de raíz y callos de *E. purpurea*, sobre el modelo de inducción por TPA. Administración vía oral de 200 mg/kg de (EER=Extracto acuoso de raíz, EECR= extracto etanólico de callo de raíz, DEXM= Dexametasona y vehículo= VEH). ANOVA, post-prueba Bonferroni * $p < 0.05$, $n = 5$.

Además, se debe enfatizar que parte de las diferencias observadas entre los diversos estudios, son también debidas al tipo de material vegetal del cual provienen los extractos. Por ejemplo, en el presente trabajo se utilizaron callos del cultivo *in vitro*, y las evaluaciones anteriores están realizados con extractos de órganos específicos de la planta o bien provenientes de la planta completa. Lo que sugiere que es posible que la actividad antiinflamatoria se deba a la asociación de células especializadas (tejidos u órganos) y que también los principios activos con actividad antiinflamatoria puedan ser acumulados, ensamblados o sintetizados en un órgano específico (Hashimoto *et al.*, 1967). Sin embargo, en el presente trabajo también se utilizaron extractos de raíz cultivada *in vitro*, y estos no presentaron actividad, lo que sugiere también que la actividad antiinflamatoria está influenciada posiblemente por la activación o estimulación de los principios activos en respuesta del vegetal al estrés ambiental (Rhodes, 1994). Kreis (2007) menciona que la acumulación de metabolitos secundarios puede estar asociada a tipos celulares determinados, a la presencia de ciertos organelos y a la expresión y regulación de genes biosintéticos y catabólicos.

Con respecto a lo anterior se tienen antecedentes donde la propiedad antiinflamatoria se asocia con el contenido de equinacósido y alcanidas (Lalone *et al.*, 2010). Se ha demostrado esta actividad debido a que los extractos inhiben tanto a la ciclooxigenasa I como a la ciclooxigenasa II (Ortega *et al.*, 2005 y Clifford *et al.*, 2002); ambas tiene una función importante en los procesos inflamatorios (Madeiros *et al.*, 2007). En las 3 líneas celulares de callos obtenidas, se identificaron alcanidas y compuestos fenólicos, sin embargo y a pesar de la presencia de estos compuestos no se presenta actividad, por lo cual se refuerza la posibilidad de que esta actividad se asocie a metabolitos secundarios sintetizados como respuestas del vegetal a su sistema abiótico con el que interactúa.

7.4.2 Evaluación de la actividad ansiolítica (prueba de Claro-Oscuro)

En esta prueba se asume que los roedores, que naturalmente presentan aversión a los espacios nuevos e iluminados cuando son colocados en un laberinto como el de CO, una vez que descubren el espacio iluminado procuraran no cruzar hacia este, a pesar de su curiosidad porque representa una zona de peligro, que les produce miedo. Recordando que el miedo es uno de los sustratos fisiopatológicos y sintomatológicos de la ansiedad. Así que, las sustancias

con propiedad ansiolítica son capaces de modificar la conducta de los ratones provocando un incremento en el tiempo de permanencia en el LC, lo cual se traduce como una disminución del miedo y por lo tanto de la ansiedad. Por otro lado, el número de cruces también son un índice de la actividad exploratoria y al disminuir el número, se asocia a un efecto depresor (Holmes *et al.*, 2001).

En la **Figura 25**, se puede observar que el grupo de animales que sólo recibieron vehículo vía oral, pasan 135 s en el lado claro, con un promedio en el número de cruces a este mismo espacio de 27. Mientras que el ansiolítico diazepam a la dosis de 1 mg/kg provoca un incremento en el tiempo de permanencia en el LC y una disminución en el número de cruces, ambos efectos significativamente diferentes al grupo control negativo ($p < 0.05$). Por otro lado el tratamiento con EECR a una dosis de 200 mg/kg vía oral induce en los animales un comportamiento similar al del fármaco ansiolítico, esto es un aumento en el tiempo en que los ratones pasan en el lado claro y una disminución en los cruces, y también estos parámetros fueron diferentes al vehículo ($p < 0.05$). Los tratamientos a 200 mg/kg con EAR y EACR no provocan diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros respecto al control negativo ($p < 0.05$).

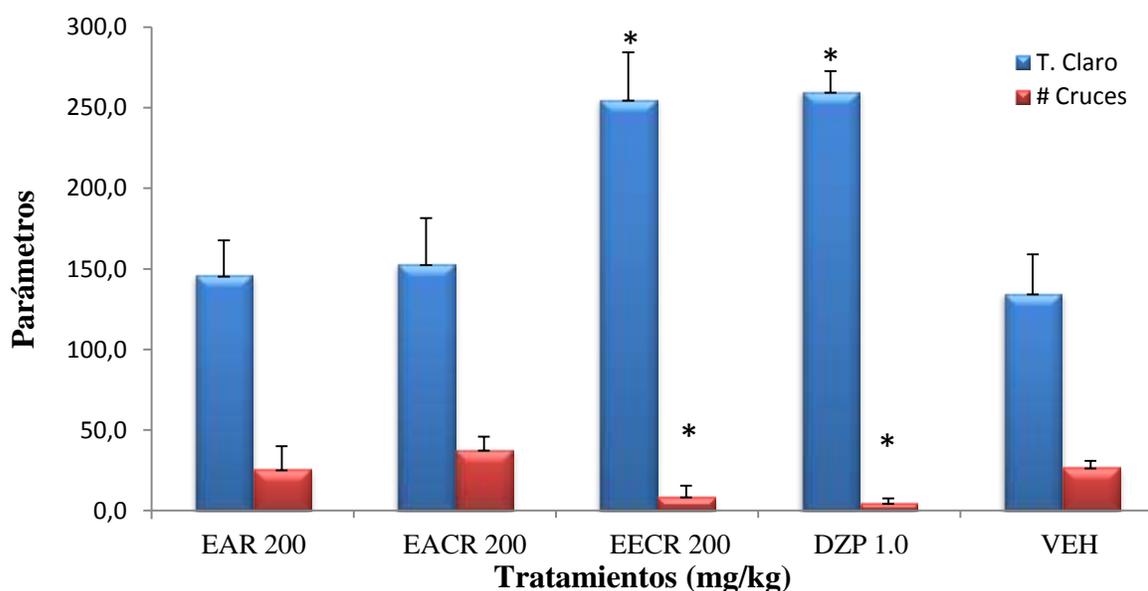


Figura 25. Tiempo de permanencia en el lado claro (T. Claro) y número de cruces totales (# Cruces), durante la prueba de Claro-Oscuro. EAR= extracto acuoso de raíz, EACR= extracto acuoso de callo de raíz, EECR= extracto etanólico de callo de raíz, DZP= diazepam, VEH= vehículo. ANOVA, post-prueba Bonferroni, $*p < 0.05$, $n = 7$.

Como se puede observar en el presente trabajo se está demostrando que el EECR ejerce un efecto ansiolítico en los ratones en la prueba de CO, con un componente depresor del sistema nervioso central, tal y como se puede deducir por la disminución en el número de cruces, este efecto concuerda con los ansiolíticos benzodiazepínicos como el DZP el cual induce una disminución de este parámetro.

Si bien, no es posible determinar el posible mecanismo de acción por el cual el extracto EECR ejerce el efecto ansiolítico asociado con una disminución de la conducta motora. Se conoce que sustancias como las benzodiazepinas, por ejemplo, son altamente efectivas en la evaluación de CO, por lo que son ampliamente utilizadas como fármacos controles, estas sustancias modulan alostéricamente al complejo GABA y al canal ionóforo de cloruro (Schousboe y Waagepetersen, 2004). Por lo tanto se puede proponer que las sustancias biológicamente activas de EECR, en los modelos de ansiedad pudieran efectuar su acción sobre sus receptores GABAérgicos, lo que provocaría una disminución de la excitabilidad neuronal, llevando a una depresión del sistema nervioso central y como consecuencia una disminución de los estados de la ansiedad, tal como lo hace el diazepam.

Con los resultados obtenidos, se decidió realizar un ensayo a diferentes dosis de EECR, en la **Figura 26** se observa que el efecto ansiolítico de este extracto también se presenta a una dosis de 100 mg/kg, siendo el dato significativamente diferente en comparación con el vehículo ($p < 0.05$). Sin embargo, el tratamiento de 50 mg/kg no presentó diferencia significativa con el vehículo ($p > 0.05$). Se puede determinar entonces que el efecto ejercido por EECR presenta un comportamiento dosis-dependiente, aunque la actividad observada para la dosis de 200 mg/kg es mayor que para la de 100 mg/kg no existe diferencia estadística entre ambos. Sin embargo, cabe destacar, que a la dosis de 100 mg/kg no hay cambio en el número de cruces, lo que significa que este extracto ejerce acción ansiolítica sin afectar la actividad exploratoria. Los resultados farmacológicos aquí presentados son relevantes, debido a que no existen antecedentes acerca de la actividad biológica de esta especie sobre modelos de ansiedad.

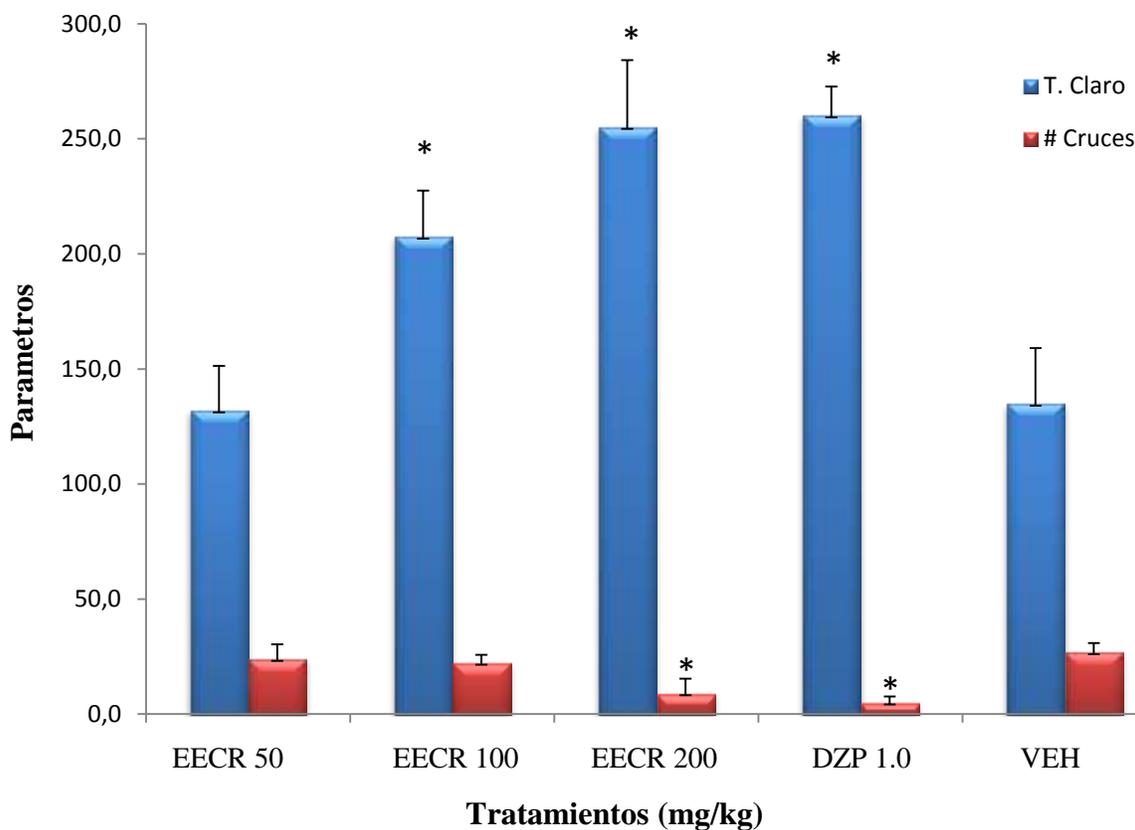


Figura 26. Tiempo de permanencia en el lado claro (T. Claro) y número de cruces totales (# Cruces), durante la prueba de Claro-Oscuro. EECR= extracto etanólico de callo de raíz, DZP= diazepam, VEH= vehículo. ANOVA, post-prueba Bonferroni, * $p < 0.05$, $n = 7$.

7.4.3 Evaluación del efecto sedante (prueba de CA)

En esta prueba se consideraron los estiramientos verticales (EV) y el número de cruces totales (CT); se evaluaron los mismos tratamientos que en las pruebas anteriores. No se encontró diferencia significativa en el número de estiramientos verticales ($p > 0.05$), solamente para el tratamiento de EECR ($p < 0.05$). El elemento donde más existe significancia estadística se aprecia en el número de total de cruces que realizan los ratones sobre todo en el tratamiento EECR con una dosis de 200 mg/kg ($p < 0.05$) (**Figura 27**).

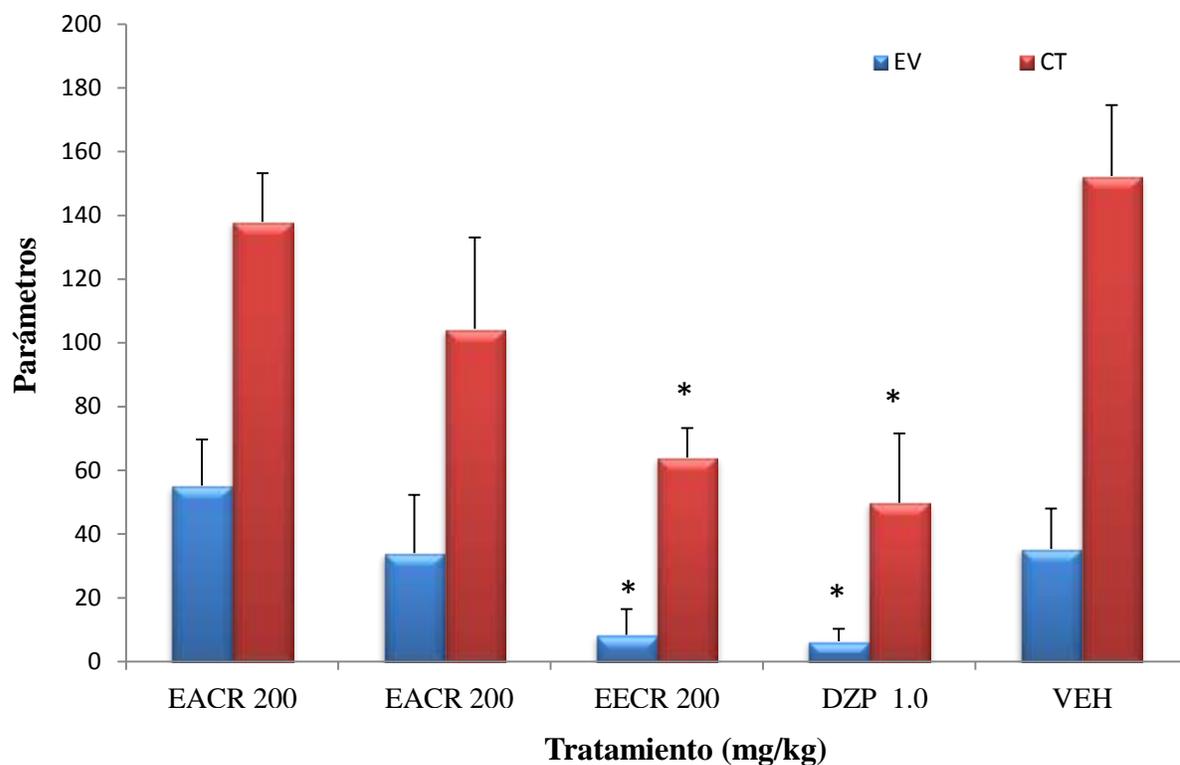


Figura 27. Número de estiramientos verticales (EV) y Cruces totales (CT), que realizaron los ratones en CA, con la administración de 200 mg/kg de EAR= extracto acuoso de raíz, EACR= extracto acuoso de callo de raíz, EECR= extracto etanólico de callo de raíz, DZP= diazepam, VEH= solución de Tween 20 al 1%. ANOVA, post-prueba Bonferroni, * $p < 0.05$, $n = 7$.

En este modelo conductual se evalúa la actividad motora espontánea mediante el conteo de los estiramientos verticales o el cruzamiento (Prut y Belzung, 2003). Cuando estos disminuyen se debe probablemente a la adaptación del animal a la prueba y a la disminución de la emocionalidad (Dandiya *et al.*, 1970), o también a un efecto depresor del sistema locomotor (Prut y Belzung, 2003). De tal manera que este modelo permite evaluar la actividad ansiolítica de la administración de fármacos o como en el presente estudio de extractos vegetales. En la **Figura 27** se observa como el tratamiento de EECR disminuye de manera significativa ambas conductas en comparación con el control, lo que permite suponer que está causando un efecto de sedación y depresor del sistema locomotor. De hecho durante la realización de la prueba los ratones al tratar de levantarse se caían drásticamente y mostraron dificultad para incorporarse. También se puede asumir que este extracto contiene compuestos polares con efecto sobre la actividad espontánea de los ratones.

En estudios fitoquímicos previos de extractos de diferentes órganos de *E. purpurea*, se han identificado grupos de compuestos como alcanidas y flavonoides (Loaiza *et al.*, 2004 y Ortega *et al.*, 2005), los cuales coinciden con los identificados mediante CCF y reveladores específicos en los extractos de las líneas celulares en este trabajo, de esta manera el efecto sobre actividad motora podría deberse a la presencia de estos grupos o bien al sinergismo entre estos. Sin embargo no se puede discernir con exactitud si es un solo compuesto o el grupo de compuestos los que ejercen dicha actividad y en la literatura registrada no existen antecedentes de esta actividad en la especie *E. purpurea*, por lo tanto el presente trabajo es el primer reporte donde se observa esta actividad farmacológica y que además ofrece una alternativa de producción masiva de materia prima proveniente del cultivo *in vitro*. Con los resultados obtenidos, se decidió realizar un ensayo para medir una dosis mayor y otra menor para el EECR, que fue el de mayor actividad.

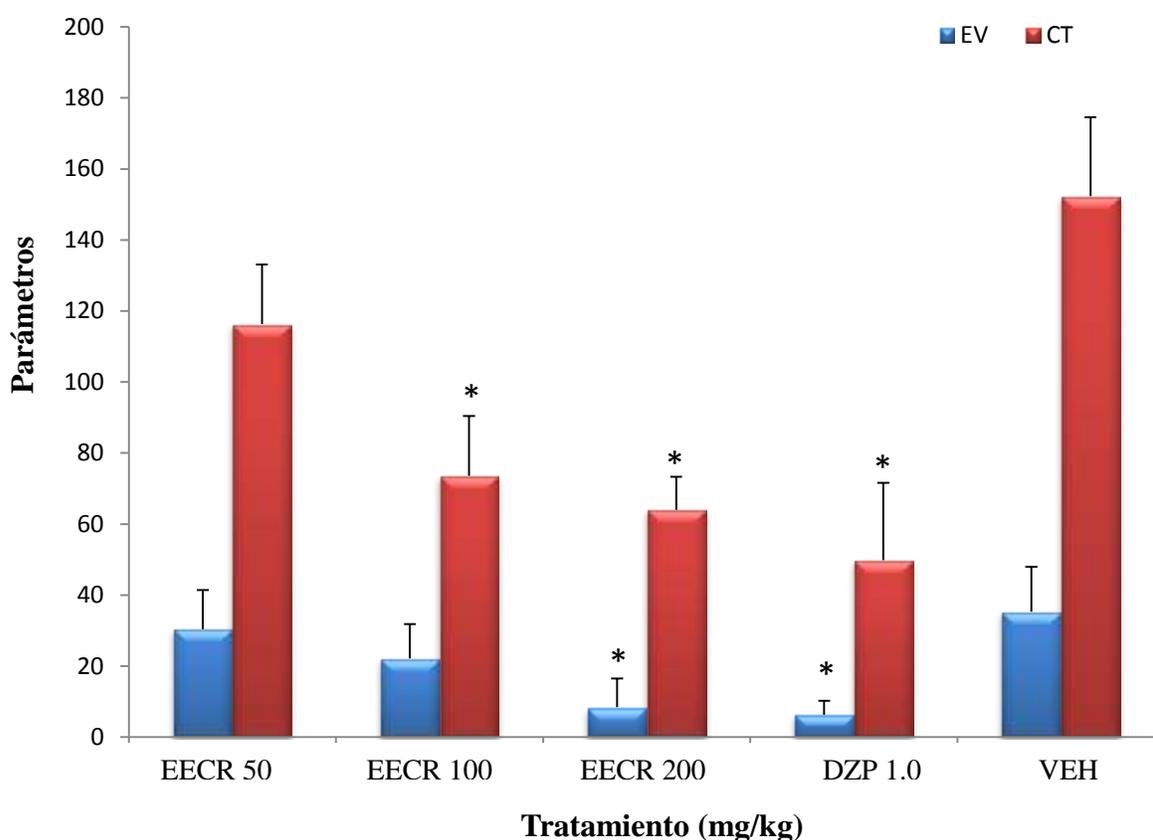


Figura 28. Número de estiramientos verticales (EV) y Cruces totales (CT), que realizaron los ratones en CA, con la administración de diferentes dosis de EECR. DZP= diazepam, VEH= solución de Tween 20 al 1%. ANOVA, post-prueba Bonferroni, * $p < 0.05$, $n = 7$.

En la **Figura 28** se puede observar que el tratamiento EECR resultó ser el único que presentó diferencia significativa con respecto al grupo vehículo ($p < 0.05$), pues fue capaz de disminuir de manera significativa los parámetros de EV y CT, resultado que más se acerca al obtenido con el DZP. Los primeros dos tratamientos con dosis de 50 y 100 mg/kg no resultaron ser significativamente relevantes en cuanto al número de estiramientos verticales ($p > 0.05$), sin embargo el tratamiento de EECR a 100 mg/kg sí afectó significativamente (disminuyendo) el número de cruces totales ($p < 0.005$), parámetro que nos sugiere que ejerce actividad sobre actividad motora sin afectar la capacidad exploratoria.

7.4.4 Evaluación del efecto sedante (prueba de Potenciación de barbitúricos)

Esta prueba se sustenta en la duración del efecto anestésico, hipnótico y relajante muscular del pentobarbital, los parámetros que se consideraron son la latencia y la duración. Los resultados obtenidos se ilustran en la **Figura 29**, donde se puede observar que en relación al tiempo de latencia no existe diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (VEH) ($p > 0.05$). En cuanto al tiempo de duración, los tres tratamientos presentaron diferencia significativa ($p < 0.005$) aunque siguen siendo significativamente diferente con el grupo que recibió dizepam ($p > 0.05$). El pentobarbital es un barbitúrico (fármaco que induce sedación e hipnosis) que tiene efectos de potenciación de las acciones de GABA, un neurotransmisor inhibitorio, por actuar sobre el receptor-ionóforo de cloruro GABA_A, produciendo hiperpolarización, lo que genera una depresión importante en el SNC (Dimarco, 1994).

Cuando un extracto vegetal administrado prolonga los efectos del pentobarbital, se puede asumir que parte del mecanismo por el cual provoca su efecto depresor es a través del sistema GABAérgico, indicando entonces que dentro del extracto vegetal existen compuestos capaces de deprimir al SNC (López y Álamo, 2006).

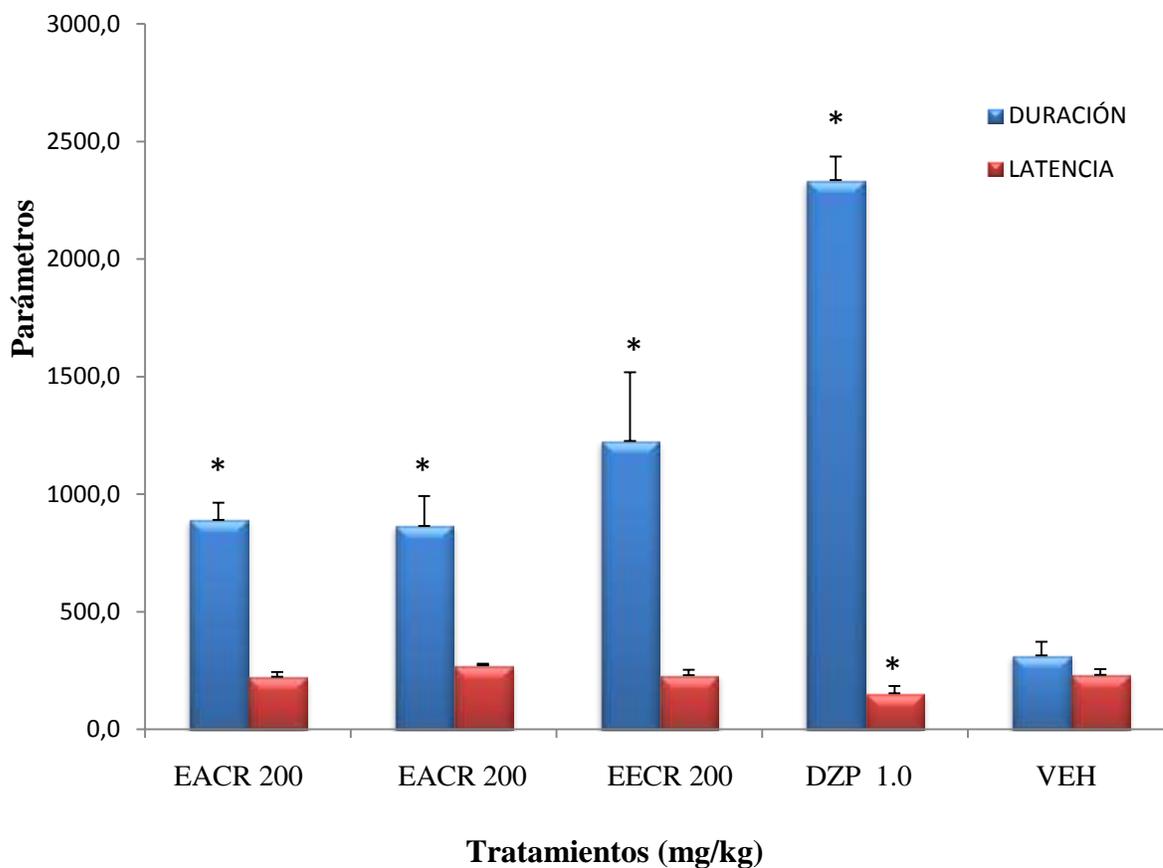


Figura 29. Tiempo de duración y de latencia del efecto de la administración de diferentes tratamientos de igual dosis (200 mg/kg), diazepam (DZP1.0), vehículo (VEH) que realizan los ratones. Tiempo que tardan en dormirse (LATENCIA) y tiempo que tardan en despertar (DURACIÓN) los ratones, n= 7. ANOVA, Bonferroni, *p<0.05.

También para este ensayo se realizó el análisis de los efectos de dosis diferentes de 200 mg/kg de EECR. Se muestra que en el tiempo de duración de la hipnosis las tres dosis del extracto de *E. purpurea*, provocan un incremento significativo con respecto al control en de dicho parámetro ($p < 0.05$), lo cual concuerda con el efecto depresor de este extracto, mostrado en las pruebas anteriores (**Figura 30**).

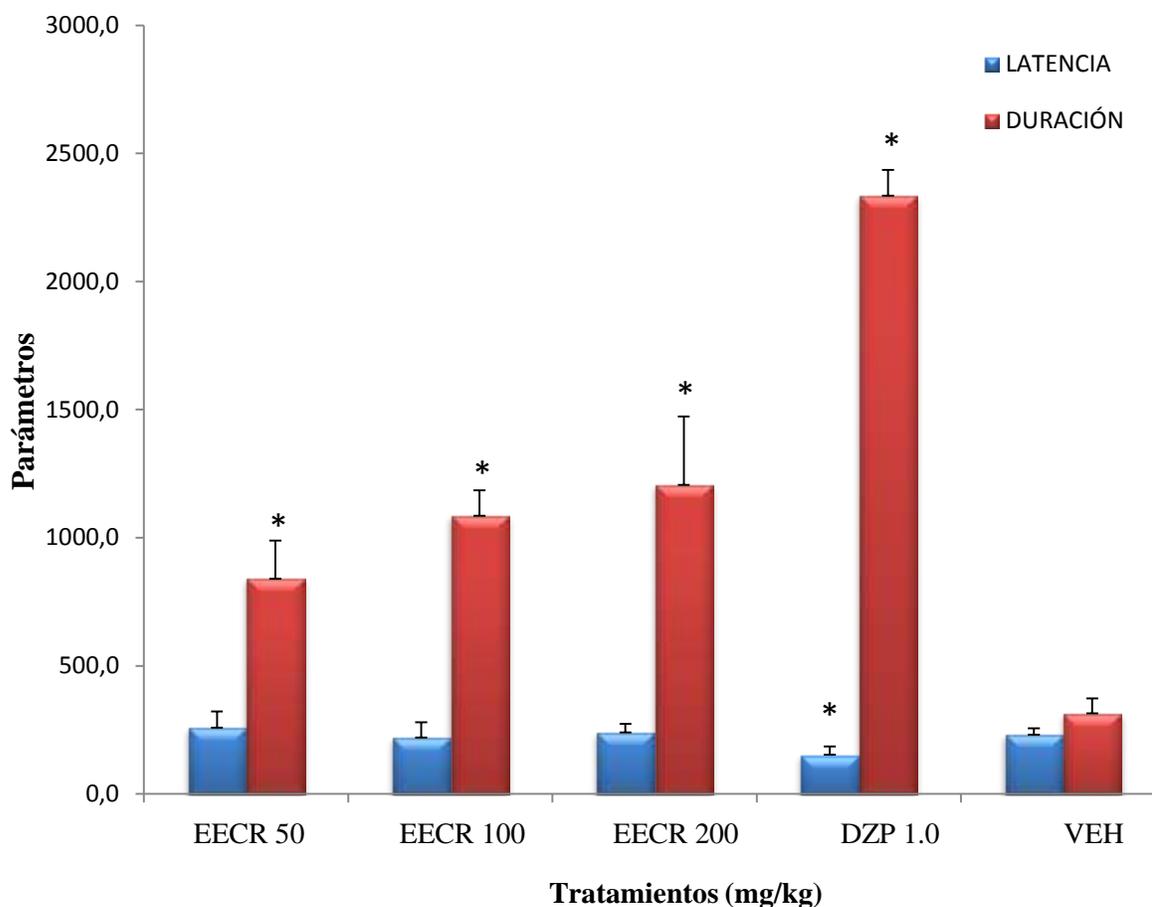


Figura 30. Tiempo de duración y de latencia del efecto de la administración de diferentes dosis de extracto etanólico de callo de raíz (EECR), diazepam (DZP1.0), vehículo (VEH) que realizan los ratones. Tiempo que tardan en dormirse (LATENCIA) y tiempo que tardan en despertar (DURACIÓN) los ratones, n= 7. ANOVA, Bonferroni, *p<0.05.

8. CONCLUSIONES

Se logró la propagación de *E. purpurea* mediante la inducción de brotes adventicios a partir de fragmentos de raíz, utilizando los reguladores del crecimiento BAP y ANA en concentraciones de 0.1 y 0.5 mg/l respectivamente.

La línea celular proveniente de raíz destacó por la mayor velocidad de crecimiento y menor tiempo de duplicación.

El mayor rendimiento de biomasa seca y de extracto, lo presentó la línea de callo de raíz. En los extractos etanólicos de raíz y de las tres líneas celulares se identificaron alcaloides y flavonoides.

Los extractos etanólico y acuoso de raíz y de callos de raíz cultivados *in vitro* no presentaron actividad antiinflamatoria en la prueba de edema auricular inducido por TPA.

La administración de extracto etanólico de callo de raíz de *E. purpurea*, a la dosis de 100 y 200 mg/kg, inducen un efecto ansiolítico, evidenciado por un incremento en el tiempo de permanencia en el lado claro que los ratones pasan en el modelo de Claro-Oscuro. El efecto ansiolítico se acompaña de un efecto depresor del SNC, como se puede observar por una disminución en el número de cruces totales en la prueba de campo abierto, actividad que coincide con la de los fármacos benzodiazepínicos como el DZP

El extracto EECR en dosis de 50, 100 y 200 mg/kg es capaz de potenciar el efecto de un barbitúrico que actúa sobre receptores GABA_A, por lo que se propone que parte del posible mecanismo de acción por el cual EECR ejerce su efecto depresor del SNC es a través de la modulación del sistema de neurotransmisión GABAérgica.

9. PERSPECTIVAS

El establecimiento del cultivo de callos friables, que presentan actividad farmacológica, es un avance en el estudio de esta especie ya que no se encontraron precedentes de actividad ansiolítica, de ahí la originalidad del mismo. En futuros trabajos se sugiere:

- Establecer el cultivo de células en suspensión y realizar la cinética de crecimiento, para compararla con las obtenidas de los cultivos de callos y evaluar si este cultivo celular presenta actividad ansiolítica o antiinflamatoria.
- Caracterizar e identificar los compuestos químicos con actividad ansiolítica presentes en el extracto etanólico de callos de raíz.
- Evaluar extractos obtenidos de los callos de base del tallo y de hoja, en modelos conductuales de ansiedad y depresión.
- Realizar una comparación del efecto ansiolítico de los extractos de callo con extractos provenientes del cultivo en suspensión y de la planta cultivada.
- Realizar pruebas de toxicidad del extracto con actividad ansiolítica y su evaluación a través de pruebas histopatológicas de órganos; debido a que el callo de raíz representa una excelente alternativa biotecnológica en la búsqueda de tratamientos contra los trastornos de ansiedad.
- Estudiar detalladamente la evaluación farmacológica de dependencia y tolerancia, para demostrar la seguridad del extracto etanólico de callo para su posible uso clínico.

10.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bauer R., Remiger P., Wagner H. (1991). “*Echinacea* especies como potenciales fármacos inmunoestimulantes”. En: H. Wagner y NR Farnsworth (eds.), Económico y de la investigación de plantas medicinales. Ed. Academic Press Vol. 5(7); p:253-321.
- Berkow R. (1994). “Neurosis fóbicas en: El Manual Merck de diagnóstico y terapéutica”. Ed. Harcourt Brace Publishers International; p:1763-1764.
- Biesma DH., Hannema AJ., Van Velzen-Blad H., Mulder L., Van Zwieten R., Kluijt I., Roos D. (2001). “A family with complement factor D deficiency”. Journal of Clinical Investigation. Ed. Cascales. Vol. 108(2); p:233-240.
- Cano V. y Tobal J. (2000). “Emociones negativas (ansiedad, depresión e ira) y salud”. 1er Congreso Virtual de psiquiatría, 1 de febrero- 15 de Marzo (22/05/2009); Conferencia 28-CI-A. Facultad de psicología. Universidad Complutense de Madrid.
- Carol M., Pelegri C., Castellote C., Franch A., Castell M. (2000). “Immunohistochemical study of Lymphoid tissues in adjuvant arthritis (AA) image analysis, relationship with sinovial lesions”. Ed. Exp. Immunol. Vol. 120(3); p:200-208.
- Carretero AME. (2000). “Compuestos fenólicos”. Ed. Panorama actual Med. Vol. 24(232); p:340-344.
- Choffe KL., Murch SJ., Saxena PK. (2001). “Regeneration of *Echinacea purpurea*: Induction of root organogenesis from hypocotyls and cotyledon explants”. Ed. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol. 62(3); p:227-234.
- Clifford LJ., Nair MG., Rana DL., Dewitt J. (2002). “Bioactividad de forma aislada de alcaloides de *Echinacea purpurea* L Moench”. Ed. Phytomedicine. Vol. 9(3); p:249-253.
- Crawford NM. (1995). “Nitrate: nutrient and signal for plant growth”. Ed. Plant Cell. Vol. 7(3); p:859-868.
- Dandiya P., Gupta B., Gupta M., (1970). “A comparative effect of central nervous system acting drugs on the open field performance in rats”. Ed. Indian J Med Res. Vol. 58(3); p:487-94.
- Davidson JR. (2002). “Use of Benzodiazepines in social anxiety disorder, generalized anxiety disorder, and posttraumatic stress disorder”. Ed. Clin Psychiatry. Vol. 65(1 5); p:29-33.

- Dimarco A. (1994). "Effects of pentobarbital anesthesia on interostal muscle activation and shortning". Ed. Appl Physiol. Vol. 77(2); p:925-32.
- Edwars R y Gatehose JA. (1999). "Secondary metabolism". Ed. Plant Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 384(5); p:193-218.
- Espinós PD., López BA., Calvo ME. (2009). "Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación". Discurso inaugural del curso. Real Academia Nacional de Medicina. Catedrático de Patología y Clínica Médicas. Facultad de Medicina. UCM.
- Eteghad SS. (2008). "Comparative survey on anesthetizing effects of medicinal herbs *Valerian officinalis*, *Melissa officinalis*, *Papaver somniferum*, and *Papaver bracteatum* on gold fish *Carassius auratus*". Ed. Iranian Scientific Fisheries Journa. Vol. 17(1); p:91-98.
- Fleurentin J. y Pelt J. (1990). "Les plantes médicinales". Ed. La Recherche. Vol. 21, p:222.
- Gabor M. (2000). "Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications". Ed. Akademi Kiadó, Budapest. Vol. 3(5); p:28-36.
- García BP. (2008). "Inflamación". IX Programa de Promoción de la Cultura Ciencia y Tecnología. Ed. Real Academia de Ciencias Exactas Física Naturales. (Esp). Vol. 102(1); p:91-102.
- Gómez L. (2004). "Micropropagación de *Echinacea purpurea* a partir de brotes y semillas". Ed. Agronomía Costarricense. Vol. 28(2); p:2-9.
- Grayer RJ. y Harborne JB. (1994). "A survey of antifungal compounds from higher plants". 1982-1993. Ed. Phytochemistry. Vol. 37(8): p:19-42.
- Gruenwald J. (1998). "PDR for Herbal Medicines". Ed. Medical Economics, Montvale, NJ. Vol. 8(9); p:28-31.
- Haller J., Freund TF., Gyimesi PK., Füredi J., Krecsak L., János Zámboi J. (2012). "The Anxiolytic Potential and Psychotropic Side Effects of an *Echinacea* Preparation in Laboratory Animals and Healthy Volunteers. Article first published online: 26 MAR 2012. DOI:10.1002/ptr.4677.
- Halperin W. (1996). "Alternative morphogenetic events in cell suspensions". Ed. Amer. Bot. Vol. 53(7); p:443-453.
- Harbaje JG., Rodríguez MM., Sánchez GP., Gaytan AE. (2009). "Relación amonio/nitrato en la producción de hierbas aromáticas en hidroponía". Ed. Agricultura técnica en México. Vol. 35(1); p:5-11.

- Hashimoto T., Kohno J., Yamada Y., (1987). "Epoxidation *in vivo* of hyoscyamine to scopolamine does not involve a dehydration step". Ed. Plant Physiol. Vol. 84(7); p:144-147.
- Holmes A., LLes JP., Meyell SJ., Rodgers RJ. (2001). "Prior test experience compromisos the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test". Ed. Behavioural Brain Research. Vol. 122(5); p:159-167.
- Instituto nacional de estadística y geografía (INEGI), (2005).
- Joffe R., Sokolov S., Streiner D. (1996). "Antidepressant treatment of depression: a meta-analysis". Ed. Can J Psychiatry. Vol. 41(5); p:613-116.
- Kent JM., Mathew SJ., Gorman JM. (2002). "Molecular targets in the treatment of anxiety. Biol". Ed. Psychiatry; p:1008-1030.
- Koroch A., Juliani HR., Kapteyn J., Simon JE. (2002). "In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants". Ed. Plant Cell, Tissue and Organ explants. Vol. 69(1); p:79-83.
- Lalone CA., Huang N., Rizshsky L., Yum M., Singh N., Hauck C., Nikolau J., Wurtele E., Kohut ML., Murphy PA., Birt DF. (2010). "Enrichment of *Echinacea angustifolia* with Bauer alkylamide 11 and Bauer ketone 23 increased anti-inflammatory potential through interference with cox-2 enzyme activity". Ed. Agric Food Chem. Vol. 58(15); p:8573-84.
- Lapa A., Souccar C., Lima LT., De Lima T. (2002). "Métodos de evaluación de la actividad farmacológica de plantas medicinales". Vol. 23(6); p:30-48.
- Letchamo W., Polideonny LV., Arnason TJ., Gladisheva NO., Arnason TJ., Livesi E., Aang DVC. (2002). Janick and Whipkey. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Levin DA. (1976). "The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores". Ed. Ann Rev. Ecol. Syst. Vol. 7(2); p:121-159.
- Liqing Z., Bochu W., Jing Z., Lingxi C., Chuanyun D., Chuanren D. (2005). "Protoplastos aislamiento de callos en *augustifolia Echinacea*". Ed. Surf coloides B Biointerfaces. Vol. 44 (1); p:1-5.
- Loaiza J., Valverde R., Gómez L. (2004). "Micropropagación de *Echinacea purpurea* a partir de brotes y semillas". Ed. Agronomía Costarricense (Costa Rica). Volumen. 28(2); p:17-26.

- López MF., Álamo C. (2006). "Historia de la Psicofarmacología". Madrid: Ed. Médica Panamericana; p:825-832.
- López MF., Álamo GC. (2006). "La revolución de la psicofarmacología: sobre el descubrimiento y el desarrollo de los psicofármacos". Historia de La Psicofarmacología. Ed. Médica Panamericana. Vol. 2(6); p:795-799.
- Lu C. Vasil IK., Ozias AP. (1982). "Somatic embryogenesis in *Zea mays* L". Ed. Appl. Genet. Vol. 3(6); p:109-112.
- Madeiras R., Otuki R, Michel F., Avellar FM., Cristina WM., Joo BC. (2007). "Mecanismos que subyacen a las acciones inhibitorias de la triterpeno pentacíclico-Amirina en la inflamación de la piel del ratón inducido por éster de forbol 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato". Ed. Europea de Farmacología. Vol.559(3); p:227-235.
- Martínez MA. (2005). "Flavonoides". Curso de Farmacognosia y Fitoquímica. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>.
- Mauk MD., Peroutka SJ., Kocsis JD. (1988). "Buspirone attenuates synaptic activation of hippocampal pyramidal cells". Ed. Neurosci. Vol. 8(5); p:1-11.
- McKeown KA. (1999). "A review of the taxonomy of the genus *Echinacea*". Perspectives of new crops and new uses. Ed. Janick. Vol 6(7); p3-20.
- Molina MM., Pereda J., Xaubet A. (2007). "Modelos experimentales para el estudio de la fibrosis pulmonar: utilidad práctica actual y futura". Ed. Arch Bronconeumol Revisiones. Vol. 43(9); p:43:501-7.
- Montero CW. (2001). "Informe de práctica de especialidad". Escuela de biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica; Cartago Costa Rica. Pág. 24-27.
- Muller WA. (2002). "Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response". Lab. Invest. Vol. 82(4); p:521-533.
- Nakadate T. (1989). "The Mechanism of Skin Tumor Promotion Caused by Phorbol Esters: Possible Involvement of Arachidonic Acid Cascade/Lipoxygenase, Protein Kinase C and Calcium/Calmodulin". Vol. 49(4); p:1-9.
- Nash J. y Potokar J. (2004). "Disorden Anxiety.Psychiatric disorders". Ed. The medicine Publishing Company. Vol 3 (5); p:17-21.
- Nash JR. y Nutt DJ. (2005). "Pharmacotherapy of anxiety". Ed. Handb Exp Pharmacol. Vol. 169(21); p:469-501.

- Organización mundial de la salud, (2001). Informe sobre la salud en el mundo. Nuevos conocimientos, nuevas esperanzas.
- Organización mundial de la salud, (2005). El contexto de la salud mental. Conjunto de guías sobre servicios y políticas de salud mental. OMS, editores médicos, S.A. EDIMSA.
- Ortega TME., Carretero MP., Gómez SC. (2005). “*Echinacea* en plantas medicinales y complementos de la dieta en las afecciones respiratorias”. Centro de Investigaciones sobre Fitoterapia (INFITO). Ed. Plant. Med. Vol. 79(8); p:348-385.
- Paek KY., Murthy HN., Hahn EJ. (2009). “Establecimiento de cultivos de raíces adventicias *Echinacea purpurea* para la producción de derivados del ácido cafeíco”. Ed. Métodos de Biología Molecular. Vol. 547(3); p:3-16.
- Palma T. (1995). “Manual de Prácticas de biotecnología de plantas”. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica. 85 p.
- Pare D., Quier GJ., Ledoux JE. (2004). “New vistas on amygdla networks in conditioned fear”. Ed. Neurophysiol; p:1-9.
- Parslow TG., Stites PD., Terr IA., Imboden BJ.(2002). “Inmunología Básica y clínica”. Ed Manual Moderno. Vol. 10(13); p:215.
- Pérez FE., Garrido G., Delgado R., Redondo HAR. (2001). “Taller nacional sobre inflamación”. Sociedad cubana de farmacología. Memorias (programas y resúmenes). Ed. CNIC. p:18-21.
- Prut L., Belzung C. (2003). “The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors”. Ed. Review, Eur J Pharmacol. Vol. 463(3); p:3-33.
- Raso GM., Pacillo M., Dicarlo G., Esposito E., Pinto L., Meli R. (2002). “*In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hipericum perforatum*”. Ed. Pharmacy and Pharmacology. Vol. 54(10); p:1379-1383.
- Rhodes M.J.C. (1994). “Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems”. Ed. Plant Mol. Biol. Vol. 24(6); p:1-20.
- Rice-Evans CA., Miller NJ., Paganga G. (1997). “Antioxidant properties of phenolic compounds”. Ed. Trends in Plant Science. Vol. 2(4); p:152-159.
- Roca P., Fonzo V., Scotta M., Zanalda E., Ravizza L. (1997). “Paraxetine efficacy in the treatment of generalizad anxiety disorder”. Ed. Psychiatr Scand. p:444-450.

- Rodríguez L., Juan F., Contreras MC. (1998). “Algunos datos recientes sobre la Fisiopatología de los trastornos por ansiedad”. Ed. Rev Biomed. Vol. 9(3); p:181-190.
- Sandoval ER. y Bosques PF. (2008). “Enfermedad inflamatoria intestinal: Realidad en México”. Ed. Gastroenterol Mex. Vol. 73(2); p:6-7.
- Santana Díaz Ana Rosa (2011). “Efecto antiinflamatorio y composición fitoquímica del extracto hidroalcohólico de plantas de *Echinacea purpurea* (L.) Moench cultivada *in vitro* y en Hidroponía”. Tesis de licenciatura. CEPROBI-IPN.
- Schlatmann J., Hoopen H., Heijnen J. (1996). “Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios”. Ed. Dyna. Vol. 76(157); p:109-121.
- Schousboe A., Waagepetersen HS. (2004). Cap 9: “GABA Neurotransmission: An Overview”. Handbook Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Ed. Springer; p:213-226.
- Secretaria de salud pública 2008. Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. Guía Práctica Clínica “Diagnóstico y Tratamiento de la enfermedad inflamatoria pélvica en mujeres mayores de 14 años con vida sexual activa. México.
- Sharma SM., Anderson M., Schoop SR., Hudson JB. (2010). “Bactericidal and anti-inflammatory properties of a standardized Echinacea extract (Echinaforce): dual actions against respiratory bacteria”. Ed. Phytomedicine. Vol. 17(8-9); p:563-8.
- Slack JMW. (2001). “Cell Differentiation”. Entry in Encyclopaedia Britannica. p:200.
- Stephenson FA., Duggan MJ., Pollard S., Thompson CL. (1994). “GABA receptor composition and function in relation to drug action”. En: Elliott JM, Heal DV, Marsden CA, Ed. Experimental approaches to anxiety and depression. New York: John Wiley & Sons Ltd. p. 169-82.
- Tanja M., Ulrike Z., Margraf J., (2007). “Epidemiology of anxiety disorders”. Atención de pacientes pobres con trastornos afectivos de la ciudad de México. Ed. Rev. Salud Pública. Vol. 39(5); p:619-26.
- Taylor M. y Reide P. (1999). “Trastornos afectivos y antidepresivos”. En: Lo esencial en farmacología. Ed. Ediciones Harcourt España. Vol. 68(7); p:47-52.
- Treviño RSL., González GD., Pedroza SM. (2009). “Manejo y control de enfermedades inflamatorias oculares con inmunosupresores”. Rev Mex Oftalmol. Vol. 83(6); p:369-376.

- VanEtten, HD., Mansfield JW., Bailey JA., Farmer EE. (1994). "Two clases of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins". Ed. Plant Cell. Vol. 6(8); p:1191-1192.
- Vicini S., Ortinski P. (2004). "Genetic manipulations of GABA_A receptor in mice make inhibition exciting". Ed. Pharmacology; p:109-120.
- Vimalanathan S., Arnason JT., Hudson JB. (2009). "Los antiinflamatorios Actividades de los extractos de *Echinacea* no se correlacionan con los componentes tradicionales del marcador". Ed. Biología Farmacéutica. Vol. 47 (5); p:430-435.
- Wagner H. y Jurcic K. (1991). "Assays for inmunomodulation and effects on mediators of inflammation". Methods an Plant Biochemistry. Academic Press (London). Ed. Hostettmann. Vol. 6(6); p:195-217.
- Wagner H., Blatt S. (1996). "Plant Drug Analysis". A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd Ed. Springer Verlag . Berlin. P:384.
- Wagner H. y Jurcic K. (2002). "Immunological studies of Revitonil®, a phytopharmaceutical containing *Echinacea purpurea* and *Glycyrrhiza glabra* root extract". Ed. Phytomedicine. Vol. 9(5); p:390-397.
- Wayner MC. (2001). "Estudio Morfogenico e Histológico de *Echinace purpurea in vitro*". Informe de práctica de especialidad. Instituto tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología, Cartago.
- WHO (World Healt Organitacion). (2004). "The World Health Report". In: Mental Health: New Understanding, New Hope. Genova.
- Zhang ZJ. (2004). "Terapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders". Ed. Life Sci. Vol. 75(7); p:1659-1699.
- Zjorumski CF., Isenberg KE. (1991). "Insights into the structure and function a GABA-Benzodiacepine receptors: ion channels and psychiatry". Ed. Psychiatry. Vol. 148(8); p:162-173.

Referencias Electrónicas

1. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=111203.
Consultada el 21 de Mayo del 2011.
2. <http://www.alimentacion-sana.com.ar/Portal%20nuevo/actualizaciones/equinacea.htm>.
Consultada el 21 de Mayo del 2011.
3. <http://www.naturalproductsinsider.com/news/2012/08/study-echinacea-may-reduce-anxiety.aspx>.
Consultada el 05 de Agosto del 2012.
4. www.psicofarmacos.info/?contenido=ansioliticos&fa.
Consultada el 15 de Septiembre del 2012.
5. <http://www.naturalproductsinsider.com/news/2012/08/study-echinacea-may-reduce-anxiety>.
Consultada el 15 de Agosto del 2012.
6. [http:// www.EuroPharmaUSA.com](http://www.EuroPharmaUSA.com).
Consultada el 15 de Agosto del 2012.