

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

Centro de Investigación en Biotecnología

**Determinación de la presencia de compuestos con capacidad
vasorrelajante en cultivos *in vitro* y *ex vitro* de *Achillea
millefolium* L.**

TESIS

QUE PARA TENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Biol. Leticia Aide Morales Luna

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

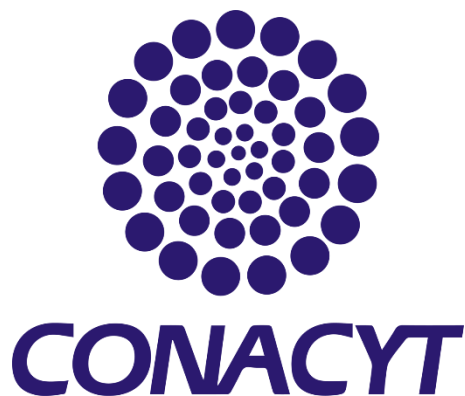
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

CUERNAVACA, MORELOS

Noviembre, 2019



El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Botánica Estructural del Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB) y el laboratorio de Farmacognosia de la facultad de Farmacia de la universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), bajo la dirección de la Dra. Irene de la C. Perea Arango y del Dr. Samuel Enoch Estrada Soto investigadores de la UAEM.



Beca CONACYT número: 629806 otorgada durante dos años en el posgrado de Maestría.

COMITÉ SINODAL

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

Laboratorio de Botánica Estructural

CeIB-UAEM

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Laboratorio de Farmacognosia

Facultad de Farmacia-UAEM

Dr. José de Jesús Arellano García

Laboratorio de Botánica Estructural

CeIB-UAEM

Dra. María del Refugio Trejo Hernández

Laboratorio de Biotecnología Ambiental

CeIB-UAEM

Dr. Ismael León Rivera

Laboratorio de Química Analítica Orgánica

CIQ-UAEM

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores de tesis: a la Dra. Irene de la Concepción Perea Arango por permitirme realizar el presente trabajo en su laboratorio, al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, por la ayuda brindada, su tiempo, paciencia y dedicación durante mi estancia, valoro y agradezco mucho.

Al comité de sinodales: Dr. Ismael León Rivera, Dra. María del Refugio Trejo Hernández y al Dr. José de Jesús Arellano García, gracias por formar parte del comité evaluador durante el desarrollo de esta tesis, por sus observaciones, palabras y tiempo brindado, les agradezco mucho.

A la Dra. Gabriela Carmona, al M. en B. Víctor Vergara, al M. en F. Luis Arias y a la M. en B. Angélica Martínez por brindarme asesorías y apoyo en el trabajo experimental, por su amistad y por hacer amena mi estancia en el laboratorio.

También agradezco al equipo de trabajo del laboratorio de Botánica Estructural por el apoyo y observaciones que me brindaron durante mi estancia.

En general agradezco a todas estas personas que se han esforzado en ayudarme a llegar al punto en el que hoy me encuentro, que este nuevo logro es gran parte gracias a ustedes.

DEDICATORIAS

Quiero agradecer a Dios por permitirme sonreír ante todos mis logros que son resultado de su bondad, por ponerme pruebas muy difíciles y darme la fuerza para superarlas, que estas lecciones de vida me sirven para mejorar como ser humano, y crecer de diversas maneras.

A mis padres Faustino Morales y Andrea Luna quienes con su amor, apoyo y esfuerzo han forjado a la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros se los debo a ustedes, gracias por inculcar en mí, el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer a las adversidades por muy difíciles que parezcan.

A mis hermanos y sobrinos por el apoyo incondicional que me han brindado, por el amor y palabras de aliento que me dieron a no rendirme cuando nos encontrábamos en momentos muy difíciles.

A mis amigos y colegas que me acompañaron durante esta etapa y que me ayudaron de una manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

1.	RESUMEN	
2.	INTRODUCCIÓN	2
3.	Antecedentes	3
3.1	Medicina tradicional	3
3.1.1	Hipertensión arterial sistémica	3
3.1.2	Características del sistema cardiovascular	4
3.1.3	Estructura de los vasos sanguíneos	5
3.1.4	Mecanismo contráctil del músculo liso	5
3.1.5	Relajación del músculo liso vascular	7
3.1.6	Participación del endotelio vascular	8
3.1.7	Síntesis de óxido nítrico	9
3.1.8	Disfunción endotelial y la hipertensión arterial	10
3.2	Planta medicinal <i>Achillea millefolium</i>	13
3.2.1	Composición química de <i>Achillea millefolium</i>	15
3.2.2	Biosíntesis de las LST	
3.3	Botánica de la especie <i>A. millefolium</i>	18
3.4	Distribución de <i>A. millefolium</i>	18
3.5	Características de la planta	19
3.6	Cultivo de tejidos vegetales	21
3.6.1	Callogénesis	
3.6.2	Cultivo de células en suspensión	22
3.6.3	Cultivo de raíces transformadas	22
3.6.4	Características de la bacteria <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	22
3.6.5	Los genes <i>rol</i>	23
3.6.6	Mecanismo de transformación	24
3.7	Aclimatización de plantúlas	25
3.8	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. millefolium</i>	
4.	Compuestos con capacidad vasorrelajante en <i>A. millefolium</i> L.	28
5.	JUSTIFICACIÓN	30
6.	HIPÓTESIS	30

7. OBJETIVOS	31
7.1 Objetivo general	31
7.2 Objetivos particulares	31
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
8.1 MATERIAL Y MÉTODOS	33
8.1.1 Material vegetal	33
8.1.2 Extracción de semillas	33
8.1.3 Desinfección de las semillas	32
8.1.4 Germinación <i>in vitro</i> de semillas y desarrollo de plántulas de <i>A. millefolium</i>	33
8.1.5 Aclimatización de vitroplantas de <i>Achillea millefolium</i>	
8.1.6 Prueba de susceptibilidad de <i>A. millefolium</i> a los antibióticos cefotaxima y ceftriaxona	34
8.1.7 Condiciones de cultivo de las cepas de K599, ATCC15834 y A4 de <i>A. rhizogenes</i>	35
8.1.8 Inducción de raíces pilosas de <i>Achillea millefolium</i> mediante la transformación con <i>A. rhizogenes</i>	36
8.1.8.1 Método I	36
8.1.8.2 Método II	36
8.1.8.3 Método III	37
8.2. Selección de líneas de raíces pilosas	37
8.2.1 Confirmación de raíces transformadas	37
8.2.2 Evaluación de la tasa de crecimiento de las líneas de raíces pilosas	38
8.2.3 Preparación de los extractos	38
8.2.4 Identificación de lactonas sesquiterpénicas	39
8.3 Evaluaciones farmacológicas	39
8.3.1 Animales	39
8.3.2 Obtención de la aorta torácica de rata	39
8.3.3 Sistema de determinación del efecto vasorrelajante (registro de datos)	39
8.3.4 Evaluación del efecto vasorrelajante	39
9. RESULTADOS	41

9.1 Germinación de semillas de <i>Achillea millefolium</i>	41
9.2 Obtención de plántulas <i>in vitro</i> a <i>ex vitro</i>	
9.3 Prueba de susceptibilidad con dos antibióticos en explantes de <i>A. millefolium</i>	44
9.4 Obtención de raíces transformadas por <i>A. rhizogenes</i>	46
9.5 Confirmación de transformación mediante epifluorescencia	48
9.6 Determinación de la producción de biomasa de las líneas de raíces pilosas:	49
9.7 Obtención de los extractos y rendimientos	49
9.8 Análisis cromatográfico de los extractos orgánicos	50
9.9 Evaluación del efecto relajante a la CE50	
10 Cromatograma de gases masa	
11. DISCUSIÓN	51
12. CONCLUSION	52
13. PERSPECTIVAS	54
14. REFERENCIAS	55
	56

II. Abreviaturas

Ácido Indol Acético	AIA
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético	2-4-D
Ácido indol-3-butírico	IBA
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido desoxirribonucleico de transferencia	T-DNA
Cadena ligera de miosina	MLC
Cinasa de cadena ligera de miosina	MLCK
Contracción de células musculares lisas vasculares	CMLV
Cromatografía de capa fina	TLC
Diacilglicerol	DG
Factor hiperpolarizante dependiente de endotelio	EDHF
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Extracto Hexánico	EH
Extracto diclorometánico	ED
Extracto metanólico	EM
Extracto hexánico integro	EHi
Hipertensión arterial sistémica	HTAS
Inductor de raíces	Ri
Iones de calcio	Ca ²⁺
Gramos	gr.
Kinetina	Kin
Medio de Gamborg	B5
Lactonas sesquiterpénicas	STL
Miligramo por litro	Mg/l
Milímetros de mercurio	mm Hg
Murashige y Skoog	MS
Óxido nítrico	NO
Óxido nítrico sintasa	NOS
Óxido nítrico sintasa endotelial	NOSe
Óxido nítrico sintasa independiente	NOSi
Proteína cinasa C	PKC
Revoluciones por minuto	rpm

Trifosfato de inositol
6-benzilamino-purina

IP3
BAP

III. Lista de figuras

- Figura 1 Sistema cardiovascular y amplificación de la arteria aorta
- Figura 2 Estructura de la arteria vascular
- Figura 3 Esquema general de la contracción del músculo liso vascular
- Figura 4 Esquema general de la relajación del músculo liso vascular
- Figura 5 Biosíntesis del óxido nítrico en la relajación del tejido endotelial
- Figura 6 Esquema simplificado para la formación de lactonas de sesquiterpeno de tipo germacrano, eudesmano y guayano
- Figura 7 Rutas biosintéticas propuestas para las lactonas sesquiterpénicas C6 – C7 y C7 – C8.
- Figura 8 *Achillea millefolium* fotografía tomada en el poblado de Tres Marías Morelos.
- Figura 9 Distribución de la especie *Achillea Millefolium* en México
- Figura 10 Estructura de la planta de *Achillea millefolium*
- Figura 11 Representación esquemática del plásmido Ri de *A. rhizogenes*
- Figura 12 Modelo del mecanismo de transformación genética mediada por *Agrobacterium*
- Figura 13 Placa cromatográfica observada en UV
- Figura 14 Placas cromatográficas de las diferentes partes de *A. millefolium*
- Figura 15 Proceso de aclimatación: A) plántulas *in vitro*, B) plántulas sembradas en tierra a los 5 meses de edad y C) recubrimiento de macetas con bolsas de plástico
- Figura 16 Sistema de evaluación del efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos de raíces pilosas de *Achillea millefolium*.
- Figura 17 A) parte floral de la planta *A. millefolium* (fotografía tomada en el poblado de Tres Marías estado de Morelos), B) semillas C) semilla observada bajo estereoscopio
- Figura 18 Proceso de germinación de la semilla de *A. millefolium* a través del microscopio
- Figura 19 A Plántula de 2 meses de edad
- Figura 20 A) Plántulas recién sembradas en tierra, B) plantas con un mes pos-aclimatación

- Figura 21 Planta con meses pos-aclimatación, presentando las primeras inflorescencias
- Figura 22 Plántulas en medio basal MS adicionado con 200, 300 ó 600 mg/L de los antibióticos cefotaxima (Cef) y ceftriaxona (Ceft) después de 3 semanas de cultivo.
- Figura 23 Explantes de *A. millefolium* infectados con las cepas A4, ATCC-15834 y K599 de *A. rhizogenes*. A) Método I; B) Método II y C) Método III.
- Figura 24 Raíces provenientes de explante de hoja observadas bajo microscopio de epifluorescencia. Se presentan las imágenes de las raíces observadas con luz blanca en los paneles A - D y la expresión de la proteína rojo fluorescente de las mismas raíces en A' - D'.
- Figura 25 Electroforesis en gel de agarosa, carriles 1-PM, 2- DNA de planta integra, del carril 3 al 10 se muestra el ADN de las raíces pilosas, marcado con rojo las raíces provenientes de la cepa A4 y con amarillo las raíces provenientes de la cepa ATCC-15834 (líneas que se usaron para este proyecto).
- Figura 26 Electroforesis en gel de agarosa al 1% amplificando el *rol-B*, carril 1. PM. 2. ADN-planta, 3. ADN cepa-ATCC-15834, 4 al 6 ADN raíces pilosas, 7-ADN cepa A4, 8-9 ADN raíces pilosas.
- Figura 27 A) Raíces pilosas provenientes de medio semisólido, B) y C) Raíces en medio líquido
- Figura 28 TLC-A): carril I y II raíces pilosas provenientes de la transformación con la cepa A4, carril del III al V raíces pilosas provenientes de la transformación con la cepa ATCC-15834, carril VI raíz de plántula *in vitro*, carril VII raíz de planta aclimatada, carril VIII raíz de planta silvestre, carril IX leucodina y carril X achillina. TLC-B): carril I hoja de plántula *in vitro*, carril II hoja de planta aclimatada, carril III hoja de plata silvestre, carril IV tallo de plántula *in vitro*, carril V tallo de plata silvestre, carril VI leucodina y carril VII achillina.
- Figura 29 Efecto vasorrelajante de los EH de las 2 líneas (A4 y ATCC15834) de raíces pilosas, en aorta aislada de rata en presencia de endotelio (Tukey's de comparación múltiple) * $p < 0.001$, Raíz silvestre vs Raíz pilosa, Raíz pilosa vs Vehículo.
- Figura 30 Cromatograma obtenido a partir del EH de la hoja de plántula aclimatada

Figura 31 Cromatograma obtenido a partir del EH de la raíz de planta aclimatada

Figura 32 Cromatograma obtenido a partir del EH de la hoja de plántula *in vitro*

Figura 33 Cromatograma obtenido a partir del EH de la hipocótilo de plántula *in vitro*

Figura 34 Cromatograma obtenido a partir del EH de la raíz de plántula *in vitro*

Cromatogramas obtenidos a partir del EH provenientes de las cepas A4 y ATCC-
Figura 35 15834 de *A rhizogenes*

IV. Lista de tablas

Tabla 1	Vasodilatadores y vasoconstrictores
Tabla 2	Aplicación del uso medicinal de la planta <i>Achillea millefolium</i> en las culturas de los diferentes países.
Tabla 3	Clasificación de la planta <i>Achillea millefolium</i>
Tabla 4	Imágenes de cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. millefolium</i>
Tabla 5	Secuencia y tamaño del amplicon de los oligonucleotidos <i>rol A</i> , <i>rol B</i> y <i>rol C</i> .
Tabla 6	Condiciones de amplificación del PCR para los genes para cada uno de los oligonucleotidos <i>rol A</i> , <i>rol B</i> y <i>rol C</i> .
Tabla 7	Porcentaje de germinación de semillas de <i>A. millefolium</i> colectadas en el 2017 en el poblado de Tres Marías del estado de Morelos
Tabla 8-A	Método I, mostrando eficiencia de transformación, N° y crecimiento estable de raíces.
Tabla 8-B	Método II, mostrando eficiencia de transformación, N° y crecimiento estable de raíces.
Tabla 8-C	Método III, mostrando eficiencia de transformación, N° y crecimiento estable de raíces.
Tabla 9	Generación de biomasa en 20 días de raíces pilosas de dos cepas (A4 y ATCC15834).
Tabla 10-A	Rendimientos de los EH de plántula <i>in vitro</i>
Tabla 10-B	Rendimientos de los EH de planta aclimatada
Tabla 10-C	Rendimientos de los EH de raíces transformadas

1.- Resumen:

Achillea millefolium es una planta medicinal que se utiliza para tratar diversas enfermedades como lo es la hipertensión arterial alta, que es una enfermedad común en la cual la sangre fluye a través de los vasos sanguíneos o arterias a presiones más altas que la normal, además, la hipertensión puede causar insuficiencia renal, ceguera y deterioro cognitivo. Siendo uno de los principales factores de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares, que es una de las primeras causas de mortalidad en México, y a pesar de que existen medicamentos para tratar la enfermedad, estos pueden ocasionar efectos secundarios en los pacientes, por lo tanto, la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos a través de técnicas biotecnológicas ha tomado mucha relevancia en los últimos años. Como lo es el cultivo de raíces a través de la transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, para este trabajo se utilizaron dos cepas A4 y ATCC-15834, en tres diferentes métodos de infección y tres diferentes explantes: hoja, planta completa de tres meses y plántula de 9 días de edad provenientes de cultivo *in vitro*, dichos explantes fueron llevados a 27 °C en condiciones de obscuridad, la eliminación de la bacteria fue a través de la combinación de dos antibióticos: ceftriaxona y cefotaxima en una concentración de 400 mg/L y posteriormente cada raíz fue cultivada en medio semisólido, las plántulas *in vitro* fueron aclimatadas, posteriormente se obtuvieron los extractos hexánicos del material vegetal, y se realizaron las siguientes pruebas, identificación de compuestos mediante cromatografía de capa fina y cromatografía de gases, la confirmación de la transformación mediante PCR convencional con la amplificación de los genes *rol*, así como la prueba farmacológica. Se logró obtener una eficiencia de transformación del 80% de los explantes de plántula completa de tres meses de edad, para ambas cepas en el método III, sin embargo, resulto ser mejor método de transformación el método II, siendo el que mayor número de raíces sobrevivieron, también se logró un porcentaje de aclimatación superior al 86% de las plántulas, el análisis por TLC indico la posible presencia de achillina y leucodina en todos los extractos (raíces pilosas, cada una de las partes que conforman a la planta (plantas *in vitro* y aclimatadas)), también se confirmó la presencia de los compuestos en las cromatoplasmas de gases donde además se detectó a matricarina otra STL, también se obtuvo un 20% y 26% de efecto vasorrelajante dependiente de concentración en aorta aislada de rata de solo dos líneas de raíces pilosas. Por lo tanto estos resultados obtenidos podrían estar favoreciendo a los cultivos *in vitro* para la producción de compuestos bioactivos de gran interés farmacológico.

2. Introducción

El sistema arterial es el encargado de aportar oxígeno y metabolitos a las distintas estructuras celulares del corazón hasta el resto del cuerpo, la cantidad de sangre que fluye a través de las arterias varía durante el ciclo cardíaco, gran parte de la perfusión del corazón se realiza por la diástole, ya que durante la sístole el aumento de la presión intraventricular comprime el lecho vascular e impide la circulación endocárdica (Bayes *et al.*, 2003).

La presión arterial y la presión de perfusión determina en gran parte el flujo coronario, cuando la presión aumenta se produce una contracción del músculo liso del vaso, que tiende a contrarrestar el aumento del flujo que induciría una elevación de la presión (Bayes *et al.*, 2003).

El incremento continuo de presión arterial por arriba de lo normal (120/80 mm Hg) es conocida como hipertensión arterial (HTA), de manera que los principales órganos en donde repercute el descontrol de la presión arterial son: el sistema nervioso, corazón, ojos y riñones (ENSANUT, 2012), por lo que se considera como un factor de riesgo muy importante para padecer enfermedades cerebrovasculares, insuficiencia renal y cardiovasculares que son responsables del 54% de las muertes que cada año se registran en México (Stevens *et al.*, 2008). Se han identificado factores que contribuyen a la aparición de HTA, como la edad, una alta ingesta de sodio, dietas elevadas en grasas saturadas, tabaquismo, inactividad física y presencia de enfermedades crónicas como obesidad, dislipidemias y diabetes.

La HTA no es una enfermedad que se pueda curar, pero debe ser controlada para evitar complicaciones, para su tratamiento se utilizan dos tipos de medidas terapéuticas: unas están destinadas a modificar los hábitos de vida y las otras son farmacológicas (Fernández, 2016), por lo que es de interés la búsqueda de compuestos provenientes de fuentes naturales para el desarrollo de nuevos fármacos, el cultivo *in vitro* de raíces transformadas a través de *A. rhizogenes* es una técnica ampliamente utilizada en la biotecnología vegetal para la multiplicación y obtención de biomoléculas de interés.

Por lo que este estudio pretende determinar el efecto vasorrelajante de los extractos hexánicos obtenidos de cultivo de raíces pilosas de *Achillea millefolium*, conocida comúnmente como plumajillo o mil en rama, que es una planta medicinal utilizada para tratar diversas enfermedades como: heridas, hemorragias, problemas menstruales, hipertensión etc.

3. Antecedentes

3.1 Medicina tradicional

Las plantas se han utilizado para curar enfermedades desde la antigüedad hasta la actualidad, la OMS en el 2004 reportó que la atención primaria de salud en los países en vías de desarrollo es de un 80% de la población que se basa en el uso de la medicina tradicional como alternativa a los medicamentos farmacéuticos (OMS, 2004). Así, existen pruebas empíricas y científicas que avalan los beneficios de diversas plantas medicinales en diferentes afecciones crónicas o leves como la hipertensión.

3.1.1 Hipertensión arterial sistémica

La hipertensión arterial sistémica (HTAS), es una enfermedad crónica que se caracteriza por una elevación de la presión sanguínea en las arterias, bien sea por elevación de la presión sistólica o de la diastólica o de ambas. Es decir, la HTAS es un trastorno que se caracteriza por la presencia de unos niveles elevados en la presión de la sangre, por encima de los requerimientos metabólicos del organismo (Sociedad Europea de Hipertensión, 2003). La tensión persistentemente alta, puede dañar a los vasos sanguíneos. Cada vez que el corazón late, bombea sangre a los vasos sanguíneos cuya función es llevar la sangre por todo el cuerpo. La tensión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos sanguíneos (arterias) al ser bombeada por el corazón. Cuanto más alta es la tensión, más esfuerzo tiene que realizar el corazón para bombear (OMS, 2013).

3.1.2 Características del sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular es un sistema cerrado, constituido por arterias, venas, capilares y vasos linfáticos, alternadamente y dispuestos en paralelo, en el que están intercalados el corazón con el ventrículo derecho y el izquierdo, el ventrículo derecho es la bomba de la circulación pulmonar, la sangre es bombeada a los pulmones donde toma oxígeno y se desprende del dióxido de carbono y luego se va a la aurícula izquierda del corazón, cuya función es bombear la sangre al resto del organismo y se le conoce como circulación sistémica, en los tejidos del cuerpo se intercambian nutrientes y productos de desecho y nuevamente se repite el ciclo (Sunthareswaran, 2004).

Las arterias transportan sangre desde el corazón a los tejidos del organismo, está formada por tejido de paredes gruesas y por fibras elásticas que le confiere una estructura elástica que

le permite su constricción y su relajación para ajustar la presión sanguínea. Los capilares son el lugar donde se produce la difusión de los nutrientes y los productos de desecho, la función de las venas es de devolver la sangre de los tejidos al corazón y la función de los vasos linfáticos es devolver a la sangre cualquier exceso de agua y nutrientes que se haya difundido fuera de los capilares, la sangre circula por los vasos sanguíneos por la presión que es producida por la eyección de sangre por los ventrículos, es máxima en la aorta (120 mm Hg) y mínima en las grandes venas (Sunthareswaran, 2004).

La aorta es un vaso sanguíneo grueso que sale del ventrículo izquierdo en forma de arco (figura 1), posee válvulas sigmoideas aórticas que únicamente permiten el paso de sangre, se abren cuando el corazón se contrae (presión sistólica), del cual se originan las arterias que van del cuello, cabeza y miembros superiores, la aorta desciende a lo largo de la columna vertebral por la cavidad torácica y el abdomen (Castellanos *et al.*, 2007).

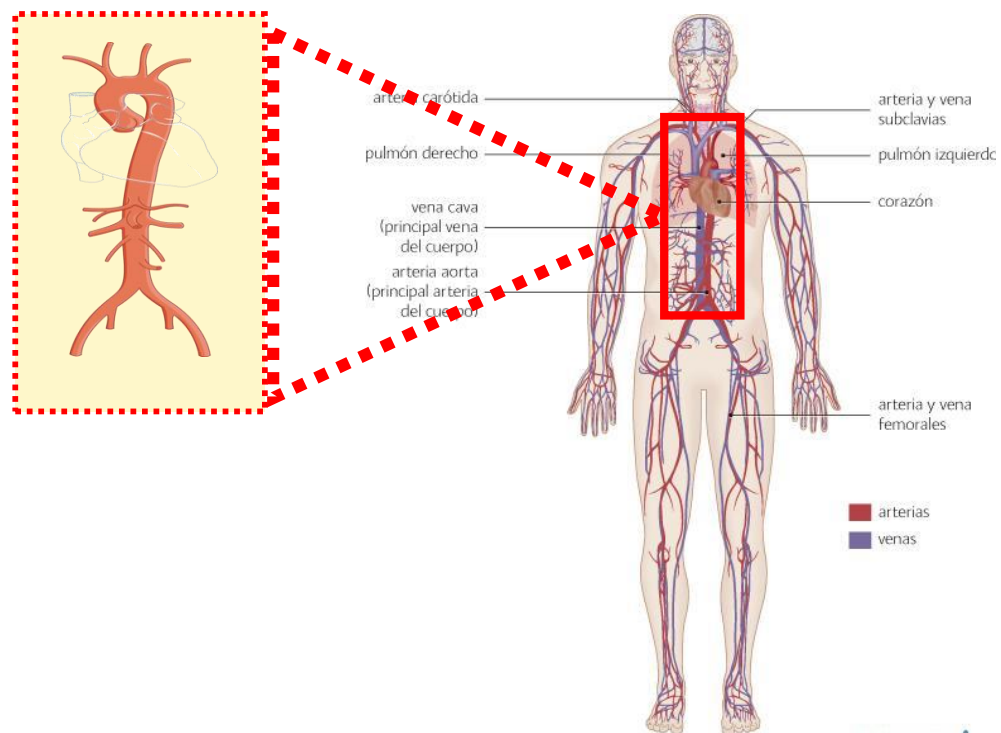


Figura 1. Sistema cardiovascular y ampliación de la arteria aorta (imagen tomada de internet y modificadas (www.bupasalud.com)).

3.1.3 Estructura de los vasos sanguíneos

Todos los vasos sanguíneos tienen un revestimiento constituido por tres capas, la primera es llamada túnica interna, compuesta por una única capa de células escamosas llamada endotelio, su lámina basal y su capa delgada de tejido conectivo laxo con fibrocitos, algunas células musculares lisas y fibras de colágeno, la segunda es una capa media llamada túnica media que está formada por músculo liso y tejido conectivo de soporte que actúa como un sistema efector de la contracción y la relajación vascular, la tercera es una capa externa de tejido elástico y conectivo llamada túnica adventicia (figura 2). La capa de músculo liso es estimulada por el sistema nervioso autónomo, pudiendo contraerse para cerrar la luz (vasoconstricción) o puede relajarse para abrir la luz (vasodilatación). La característica principal de las arterias es que poseen mayor cantidad de músculo liso y tejido elástico, lo que les permite soportar las altas presiones y mantener la presión sanguínea y el flujo de sangre continuo (Welsch, 2008).

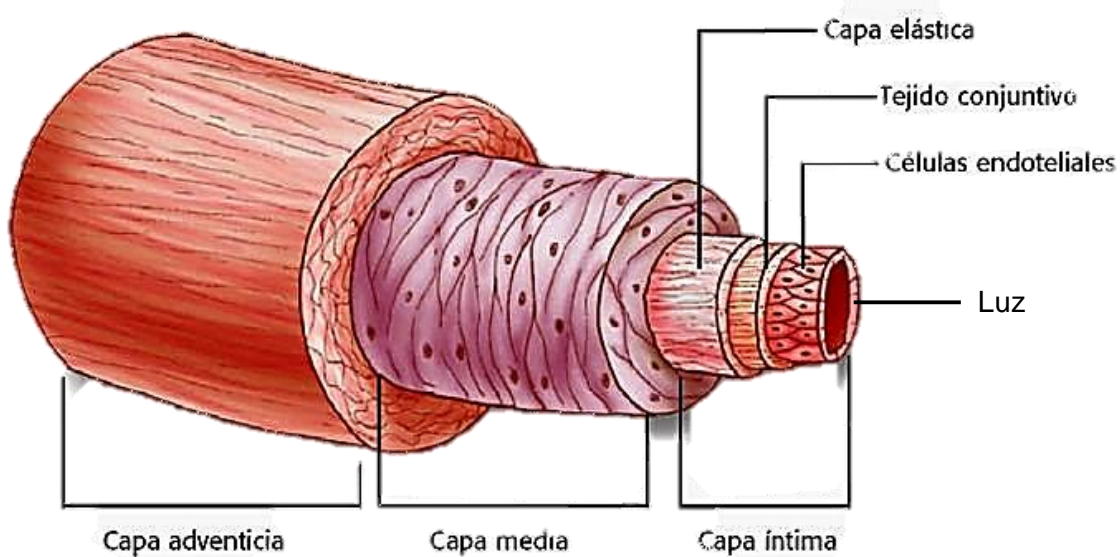


Figura 2. Estructura de la arteria vascular (Lahera *et al.*, 2010).

3.1.4 Mecanismo contráctil del músculo liso

En el vaso intacto, el proceso de contracción de las células musculares lisas vasculares (CMLV) está regulado principalmente por estímulos mecánicos (estiramiento) que inducen la activación de las proteínas contráctiles actina y miosina. Cambios en el potencial de membrana, provocados por el disparo de potenciales de acción o por activación de canales

iónicos dependientes de estiramiento en la membrana plasmática, también pueden desencadenar la contracción (Fukata *et al.*, 2001).

La contracción y relajación de las células musculares lisas a nivel de las arterias musculares controlan la presión arterial y, por consiguiente, el flujo sanguíneo. Estas células se contraen cuando son estimuladas por un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} por su entrada a través de la membrana plasmática y por su liberación de las reservas intracelulares (Guyton, 2001), la contracción de las células vasculares del músculo liso (CMLV) es iniciada por calcio y es mediada por el cambio en los filamentos gruesos, a diferencia de lo que ocurre en el músculo estriado (filamentos finos). La concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta en respuesta a estímulos específicos, y cuando este ion se combina con la proteína ácida calmodulina, forma un complejo que activa a la miosina de cadena ligera cinasa (MLCK) para fosforilar la cadena ligera de la miosina (Morgan, 1990).

La concentración citosólica de Ca^{2+} se incrementa por liberación desde el retículo sarcoplásmico, así como por entrada desde el espacio extracelular a través de canales operados por receptores. Diversos agonistas (norepinefrina, angiotensina II, endotelina, etc.) capaces de unirse a receptores acoplados a una proteína G heterotrimérica, estimulan la actividad de la fosfolipasa C (figura 3). Esta enzima cataliza, a partir del lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (IP_3), la formación de dos potentes segundos mensajeros: IP_3 y DG (diacilglicerol). La unión de IP_3 a los receptores en el retículo sarcoplásmico provoca la liberación de Ca^{2+} en el citosol. DG junto con Ca^{2+} , activan a PKC, que fosforila a las proteínas diana específicas. Por otra parte, los canales de Ca^{2+} tipo L operados por voltaje en la membrana también se abren en respuesta a la despolarización de la membrana provocada por estiramiento de la CMLV (Mitchel *et al.*, 2003).

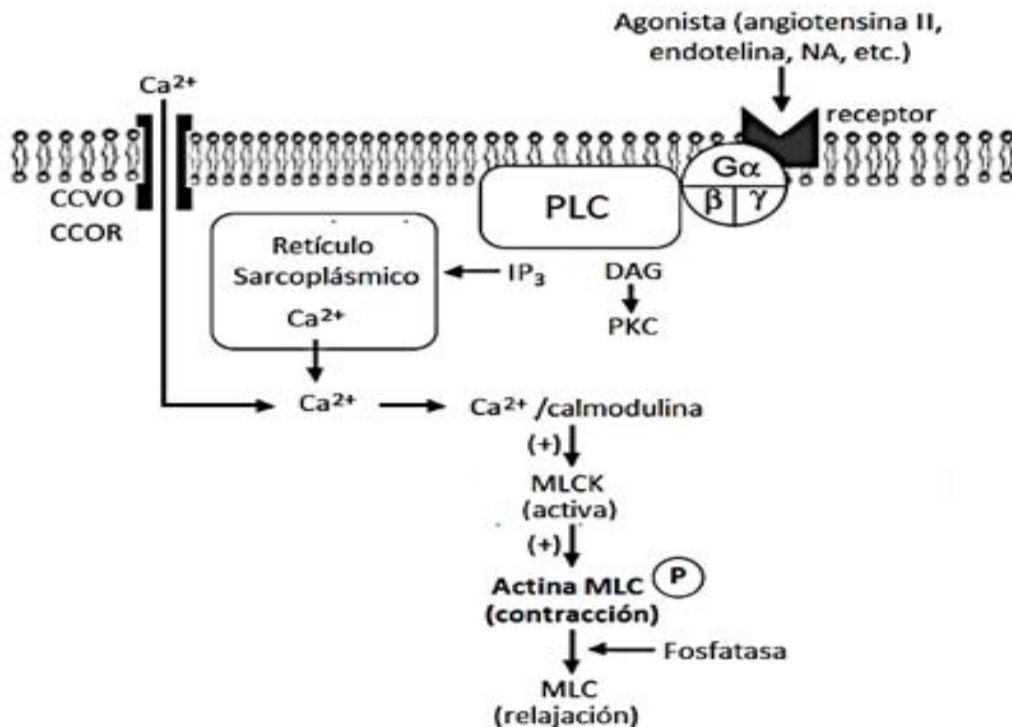


Figura 3. Esquema general de la contracción del músculo liso vascular (Martin, 2012).

3.1.5 Relajación del músculo liso vascular

La relajación del músculo liso se produce ya sea como resultado de la eliminación del estímulo contráctil o por la acción directa de una sustancia que estimula la inhibición del mecanismo contráctil. El proceso de relajación requiere una disminución de Ca²⁺ intracelular y el aumento de actividad de la MLC fosfatasa (Jin *et al.*, 2003).

La disminución Ca²⁺ en la concentración intracelular provoca la relajación de CMLV. Varios mecanismos están implicados en la eliminación de Ca²⁺ citosólico e involucran al retículo sarcoplásmico y a la membrana plasmática. La captación de Ca²⁺ en el retículo sarcoplásmico depende de la hidrólisis de ATP. La Ca-ATPasa, cuando está fosforilada, se une a dos iones de Ca²⁺, que luego se trasladan a la cara luminal del retículo sarcoplásmico y son liberados. El magnesio es necesario para la actividad de la enzima, dado que se une al sitio catalítico de la ATPasa (Mills *et al.*, 2001).

La membrana plasmática también contiene Ca-ATPasas, proporcionando un mecanismo adicional para reducir la concentración activa de Ca²⁺ en la célula. Esta enzima se diferencia de la proteína sarcoplásmica reticular porque tiene un dominio de autoinhibición que puede estar vinculado con la calmodulina, causando la estimulación de la bomba de Ca²⁺ de la

membrana plasmática. Los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ están ubicados en la membrana plasmática y contribuyen a la disminución de Ca^{2+} intracelular. Canales de Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática, operados por receptores o por voltaje, son importantes en el influjo de Ca^{2+} y la contracción de CMLV. Su inhibición puede provocar relajación, los antagonistas de estos canales se unen a diferentes receptores sobre la proteína del canal e inhiben la entrada de Ca^{2+} en el músculo liso (figura 4) (Sah *et al.*, 2000).

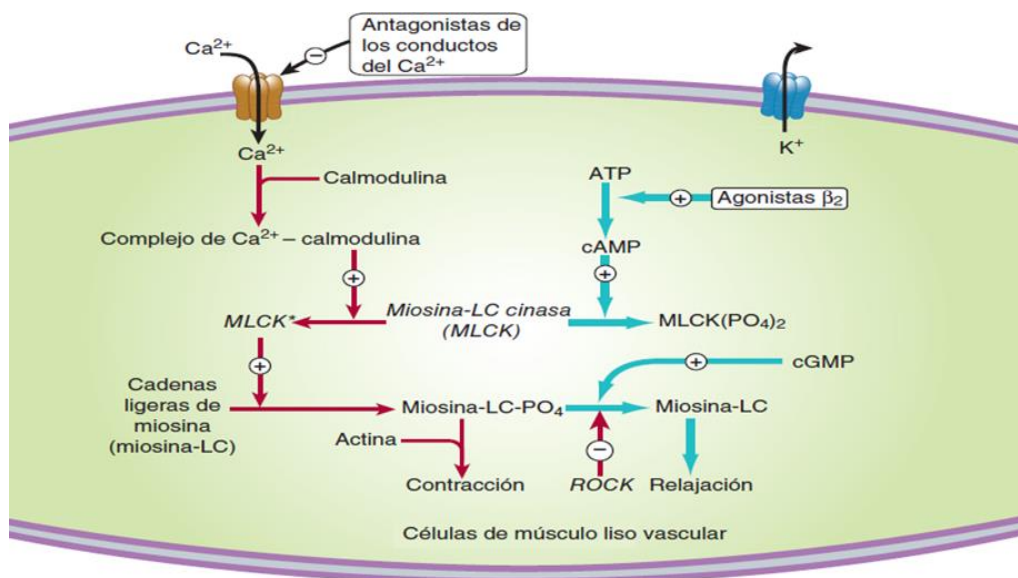


Figura 4. Esquema general de la relajación del músculo liso vascular (imagen tomada de internet).

3.1.6 Participación del endotelio vascular

El endotelio vascular, es estructuralmente simple y funcionalmente complejo, es una capa unicelular que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos, lejos de ser sólo una barrera mecánica entre la sangre y los tejidos, es un órgano activamente comprometido en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Debido a su ubicación detecta cambios en las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre la pared vascular, así como señales químicas transportadas por la sangre y responde a ellas liberando sustancias vasoactivas, algunas de la cuales tienen funciones antagónicas como vasodilatadores y vasoconstrictores como se muestra en el siguiente cuadro (Furchgott *et al.*, 1990).

FUNCIÓN	SUSTANCIA
Vasodilatadores	Óxido nítrico Prostaciclina (PGI ₂) EDHF CNP
Vasoconstrictores	Endotelina Angiotensina II Tromboxano A ₂ Anión superóxido

Tabla 1: vasodilatadores y vasoconstrictores

El papel fundamental del endotelio como regulador de la vasodilatación, al describir el fenómeno de relajación del músculo liso vascular dependiente de endotelio. Se muestra que los anillos arteriales previamente contracturados se puede relajar sólo si las células endoteliales estaban intactas. Eliminando el endotelio se anula la vasorelajación, lo cual sugiere que esta mediada por alguna sustancia que deriva del endotelio denominado factor hiperpolarizante dependiente de endotelio (EDHF) (endothelium dependent hiperpolarizing factor). Posteriormente se demostró que el EDRF era el óxido nítrico (NO). El NO difunde al músculo liso vecino, activa la enzima guanilato-ciclasa soluble, por lo cual aumentan los niveles celulares del segundo mensajero GMPc, que a su vez relaja a la célula muscular por disminuir el calcio citosólico necesario para la interacción de las proteínas contráctiles. La mayoría de los estímulos vasodilatadores, como el flujo sanguíneo y numerosos agonistas de receptores de membrana acoplados a proteína G, relajan indirectamente al músculo liso vascular a través de la liberación endotelial de NO.

3.1.7 Síntesis de óxido nítrico

El NO es producido a partir del aminoácido básico L-arginina por tres diferentes isoformas de la NO-sintasa (NOS), la endotelial (NOSe), la neuronal (NOSn), y la inducible (NOSi), son expresadas en prácticamente todos los tipos de células vasculares, pero es la isoforma endotelial la principal responsable de la síntesis de NO en las células endoteliales. La síntesis de NO depende de la unión de la NOS a la proteína calmodulina. Para unir calmodulina y en consecuencia activarse, NOSe y NOSn requieren aumentos del Ca²⁺ intracelular (Panda *et al.*, 2002).

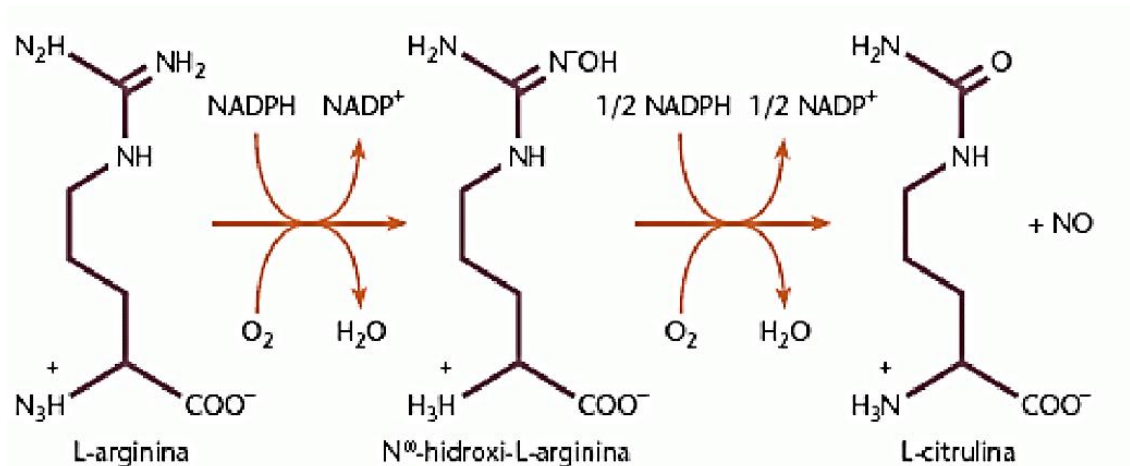


Figura 5. Biosíntesis del óxido nítrico en la relajación del tejido endotelial (Condes, 2014).

En contraste, NOS_i, que tiene una afinidad alta con calmodulina, puede unirse a esta proteína a concentraciones muy bajas de Ca²⁺. Así, la actividad de NOS_e y NOS_n está críticamente regulada por los cambios transitorios del Ca²⁺ intracelular en respuesta a estímulos diversos, mientras que la actividad de las NOS_i es independiente de Ca²⁺ y puede mantenerse tónicamente activa durante varios días.

3.1.8 Disfunción endotelial y la hipertensión arterial

La alteración de la función endotelial, que se manifiesta por el desorden del control del tono vasomotor en la hipertensión arterial, el endotelio vascular está deteriorado y promueve cambios funcionales de la pared vascular (Vita *et al.*, 1990). Los pacientes hipertensos tienen deprimida la relajación dependiente de endotelio y este trastorno está asociado a una menor bioactividad del NO, el aumento de flujo sanguíneo en el antebrazo en respuesta a distintos agonistas que estimulan la producción de NO, como acetilcolina, sustancia P y bradicinina, es significativamente menor en pacientes hipertensos que en normotensos, esta diferencia desaparece cuando ambos grupos son previamente tratados con NGmonometil-L-arginina (L-NMMA), un inhibidor de la NOS y además, los hipertensos presentan una respuesta vasodilatadora conservada al nitroprusiato de sodio, dador de NO que actúa directamente sobre el músculo liso vascular.

La ausencia de la respuesta relajante mediada por NO, se manifiesta también en un aumento de la contracción del músculo liso vascular en respuesta a diversos vasoconstrictores como,

endotelina a través de sus receptores ETA y ETB, serotonina estimulando su receptor 5-HT_{2A} y noradrenalina interactuando con el receptor α ₁- adrenérgico (Chin-Dusting *et al.*, 2007).

Si no se controla, la hipertensión puede provocar infarto de miocardio, hipertrofia ventricular y finalmente, insuficiencia cardíaca. En los vasos sanguíneos, la presión alta puede provocar dilataciones (aneurismas) y zonas de debilidad en la pared vascular, lo que aumenta las probabilidades de obstrucción y rotura. La presión en los vasos sanguíneos también puede causar fugas de sangre hacia el cerebro y esto puede causar accidentes cerebrovasculares. Además, la hipertensión puede causar insuficiencia renal, ceguera y deterioro cognitivo. Siendo uno de los principales factores de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares, que es una de las primeras causas de mortalidad en México (Stevens, 2008).

En el mundo, las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año, casi un tercio del total. Entre ellas, las complicaciones de la hipertensión causan anualmente 9,4 millones de muertes. La hipertensión es la causa de por lo menos el 45% de las muertes por cardiopatías, y el 51% de las muertes por accidente cerebrovascular.

La presión arterial normal se mide en milímetros de mercurio (mm Hg), y se registra con un primer número (120 mm Hg) que corresponde a la presión arterial sistólica que se produce cuando el corazón se contrae y un segundo número (80 mm Hg) que corresponde a la presión diastólica, que es producido cuando el musculo cardiaco se relaja entre un latido y otro (OMS, 2013). Uno de cada 4 adultos en México padece hipertensión arterial (25.5%) de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT 2016). Para clasificar a un individuo como hipertenso, debe tener una presión arterial mayor a 140/90 mmHg. De acuerdo a la ENSANUT 2016 la hipertensión se presenta ligeramente más en mujeres (26.1%) que en hombres (24.9%). El grupo de edad menos afectado es el de 20 a 29 años, mientras que la prevalencia más alta está en el grupo de 70 a 79 años (INSP, 2016).

Entre los factores que se han identificado y que contribuyen a la aparición de HTA, diversos estudios citan la edad, una alta ingesta de sodio, dietas elevadas en grasas saturadas, tabaquismo, inactividad física y presencia de enfermedades crónicas como obesidad y diabetes. En México, estas enfermedades han sido caracterizadas epidemiológicamente a partir de las encuestas nacionales de salud de los años 2000 a 2012.

En el 2016 se enlistaron las causas de muertes más frecuente según el INEGI y la OMS en México y en el mundo (OMS, 2016).

- Cardiopatía isquémica 7,4 millones
- Accidentes cerebrovasculares 6,7 millones
- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica 3,1 millones
- Infecciones vías respiratorias inferiores 3,1 millones
- Cáncer de tráquea, bronquios y pulmón 1,6 millones
- VIH/Sida: 1,5 millones
- Enfermedades diarreicas 1,5 millones
- Diabetes mellitus 1,5 millones
- Accidentes de tráfico 1,3 millones
- Cardiopatía hipertensiva 1,1 millones

3.2 Planta medicinal *Achillea millefolium*

Achillea millefolium, es una planta medicinal que fue utilizada por primera vez por los antiguos griegos hace más de 3.000 años (donde deriva su nombre “aquilea” por Aquiles un guerrero de la mitología) para el tratamiento de heridas externas en la piel de sus soldados (Benedek *et al.*, 2007). La planta suele prepararse de diferentes formas en la medicina tradicional, como infusión mezclada con otras hierbas (intensifica la acción medicinal cuando se toma con otras plantas), decocciones (té), jugos, pomada o cataplasma.

Las diferentes partes de la planta se le han atribuido propiedades medicinales específicas para tratar puntualmente ciertas enfermedades o dolencias de las personas dependiendo de la cultura, por ejemplo, las flores se usan para tratar diversos problemas de alergia (Jalil *et al.*, 2007). Las hojas fomentan la coagulación, por lo que se pueden utilizar las hojas jóvenes para tratar las hemorragias, las partes aéreas de la planta se usan para tratar el dolor de estómago, la diarrea, el vómito, también son utilizadas para la estimulación de la circulación sanguínea y el control de la hipertensión (Alonso *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2004).

En la medicina veterinaria las partes aéreas son usadas para tratar la enfermedad de abomaso desplazado (enfermedad común del tracto gastrointestinal en el ganado lechero) en bovinos (Mojtaba *et al.*, 2017), se sabe que la parte más activa de la planta medicinalmente es la parte floral por la presencia de metabolitos secundarios bioactivos. En la tabla 2 se describen algunos usos de *A. millefolium* en la medicina tradicional de países de Europa, Asia y América

El uso excesivo de *A. millefolium* presenta efectos secundarios, por ejemplo: el uso prolongado puede aumentar la fotosensibilidad de la piel ocasionando dermatitis de contacto, o exantema (erupciones en la piel de color rojizo), debido a la presencia de algunas lactonas sesquiterpénicas que presentan el grupo alfa-metil-gammalactónico, por otra parte no se recomienda el uso de la planta durante el embarazo por su contenido de alcanidas porque es un estimulante uterino, así mismo el aceite esencial en dosis elevadas puede producir cefaleas y vértigo (Fonnegra y Jiménez, 2007).

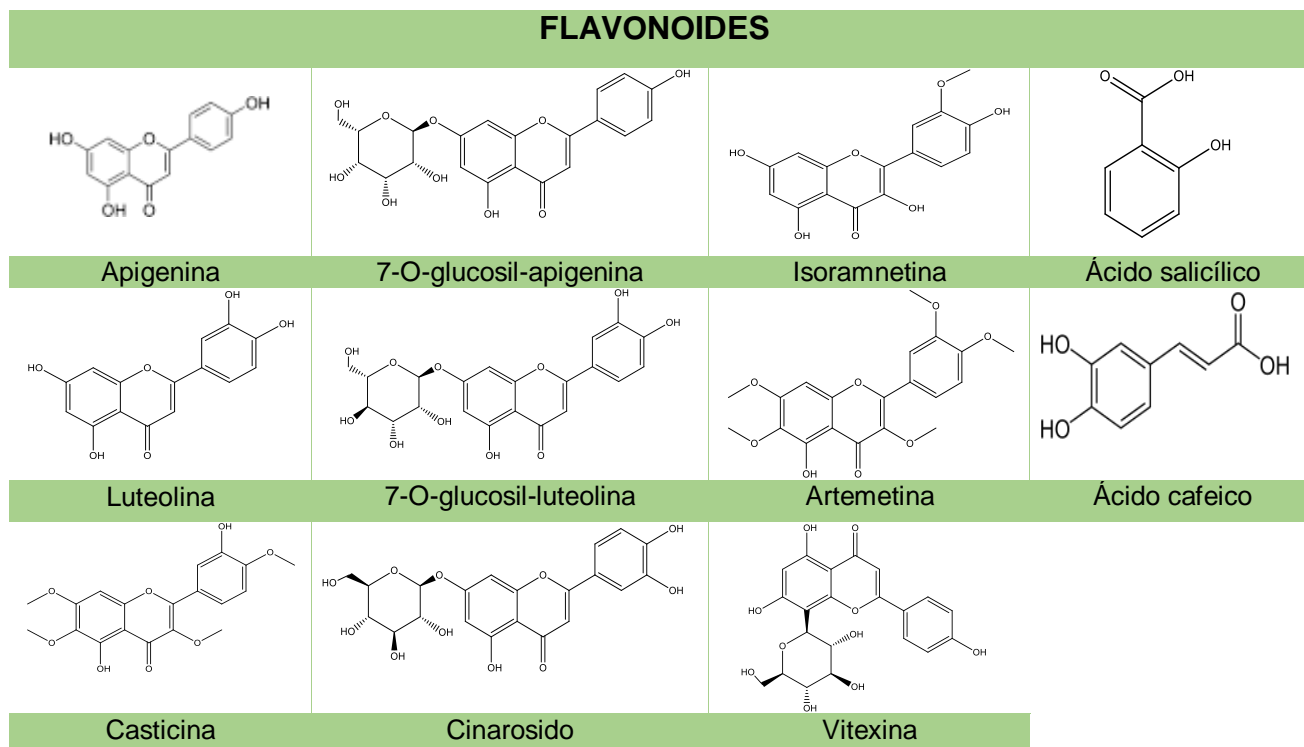
Lugar	Tratamiento	Referencia
Europa	Trastornos gastrointestinales, pérdida de apetito, problemas menstruales, como un diaforético, inflamaciones de la piel, heridas y hemorragia externa	Wichtl, 2004 y Willuhn, 2002
Irán	Inflamación, dolor y trastornos gastrointestinales, hemorroides, dispepsia, dismenorrea y gastritis	Miraldi <i>et al.</i> , 2011
Italia	Problemas menstruales, diurético, problemas urinarios, dolor de muelas, sedante y trastornos gastrointestinales	Applequist y Moerman, 2011
Hungría	Afecciones internas, así como quemaduras y heridas	Applequist y Moerman 2011
Perú	Gastritis, diabetes, colesterol e infecciones de la piel	Busmann <i>et al.</i> , 2007
Brasil	Heridas, problemas de la piel y gastrointestinales, diarrea.	Pires <i>et al.</i> , 2009
Gran Bretaña e Irlanda	Heridas, hemorragias nasales, uterinas, hipertensión, infecciones respiratorias, fiebres y reumas	Allen y Hatfield, 2004
China	Mordidas de serpiente, heridas, hemorroides, venas varicosas, dismenorrea y tuberculosis	Applequist y Moerman, 2011
India	Problemas gástricos y fiebre	Sharma <i>et al.</i> 2004
México	Alferecía (boca se torna a color morado, sueño y piel amarilla), Ciclo menstrual, dolor de estómago, diarrea, vómito, ataque al corazón, hipertensión, indigestión, insomnio, migraña, hiperglucemia.	Molina <i>et al.</i> , 2004 y Castro <i>et al.</i> , 2012
Francia	Antioxidantes, enfermedades bacterianas y micóticas	Chaker <i>et al.</i> , 2017

Tabla 2. Aplicación del uso medicinal de la planta *Achillea millefolium* en las culturas de los diferentes países.

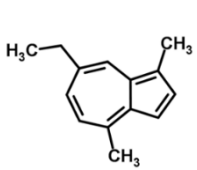
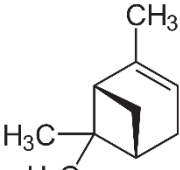
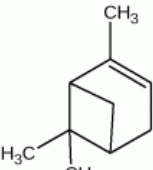
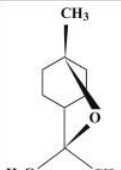
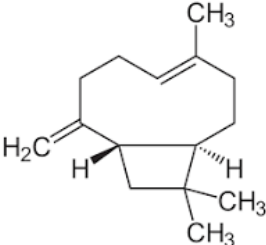
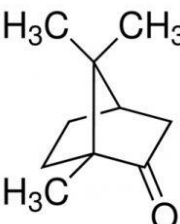
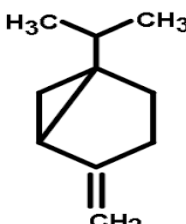
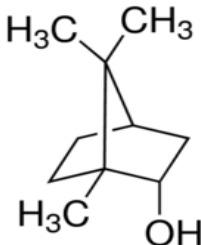
3.2.1 Compuestos bioactivos identificados en *Achillea millefolium*

Los estudios sobre los componentes químicos que se encuentran en cada una de las partes (flores, hojas y tallos), que conforman a *A. millefolium* se remontan al siglo XIX y se han encontrado muchos compuestos hasta ahora, a los cuales se le atribuyen una diversidad de propiedades farmacológicas (que ya fueron mencionadas anteriormente) (Imtiyaz *et al.*, 2017). Sin embargo, la variación en la composición de estos componentes químicos puede deberse a diversos factores relacionados con la altitud y condiciones ambientales como la temperatura, fotoperíodo, humedad, etc. Además, el origen genético puede ser el factor responsable de afectar la química de los metabolitos secundarios de las plantas (Zahara *et al.*, 2014).

Los metabolitos secundarios de las plantas se encuentran en menor proporción en comparación con los metabolitos primarios, a pesar de ello, los metabolitos secundarios tienen una función relevante en los mecanismos de adaptación y defensa de la planta al estrés biótico y abiótico. Algunos de los metabolitos secundarios identificados en *A. millefolium* son: flavonoides como la apigenina, luteolina, 7-O-glucosil-apigenina y 7-O-glucosil-luteolina, isoramnetina, artemetina, casticina y varias C-glicosilflavonas como vitexina, cinarosido, así como los ácidos fenólicos (ácido cafeico y ácido salicílico).



El aceite esencial puede llegar a contener más de un 20% (20-50%) de camazuleno, formado durante la destilación por deshidratación y descarboxilación de lactonas sesquiterpénicas de núcleo guayanólido, principalmente aquilicina (proazulenos). Se sabe que la composición del aceite esencial varía según el cariotipo de la planta. Los componentes principales del aceite esencial con azulenos, además del camazuleno, son beta-pineno y alfa-pineno (en menor proporción) y cariofileno. Los del aceite esencial sin azulenos son el alcanfor, sabineno, 1,8-cineol, alfa-pineno e isoartemisiacetona, borneol, limoneno etc. (muñoz *et al.*, 1999; Ali *et al.*, 2017). En los aceites esenciales de *A. millefolium* los monoterpenos son los metabolitos más representativos que constituyen el 90% del aceite esencial en relación con los sesquiterpenos (Muñoz *et al.*, 2014).

Aceite esencial			
			
Camazuleno	β-pineno	α-pineno	1,8-cineol
			
Cariofileno	Alcanfor	Sabineno	Borneol

Otro de los compuestos relevantes de la planta son las lactonas sesquiterpénicas (STL), que son metabolitos secundarios característicos de la familia Asteraceae ya que son utilizados como marcadores quimiotaxonómicos, la biosíntesis, la diversidad química, estructural y las propiedades fisiológicas de las STL dependen de la adaptación de la planta (Picman, 1986).

Las estructuras de las STL varían, pero su estructura básica consiste en un esqueleto sesquiterpenico de C¹⁵ y un anillo lactonico, prácticamente la estructura de los sesquiterpénicos es principalmente de tres formas: germacranólidos, eudesmanólidos y guaianólidos (Adio A, 2009; Fischer N, 1999).

Las germacranólidas son compuestos con esqueleto germacrano (anillo flexible (E, E)-ciclodeca-1(10), 4-dieno) siendo este el más común y un anillo γ -lactona cerrado sobre las posiciones C-7/C-6 o C-7/C-8. Las eudesmanolidas están formadas por dos biciclos de seis miembros fusionados y un anillo γ -lactona cerrado sobre las posiciones C-7/C-6 o C-7/C-8. Las guayanolidas están formadas por dos biciclos uno de cinco y otro de seis miembros fusionados y un anillo γ -lactona cerrado sobre las posiciones C-7/C-6 o C-7/C-8, las cuales presentan una gran variedad de propiedades biológicas y han sido ampliamente estudiadas (Ruíz y Suárez, 2015).

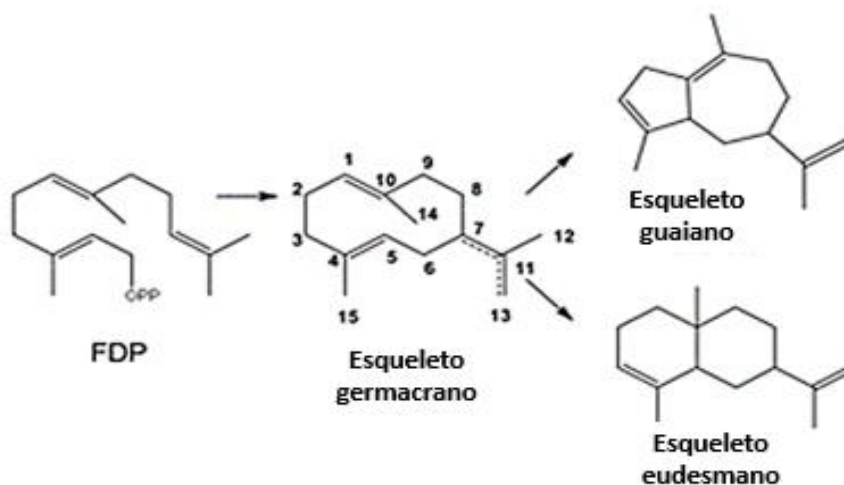
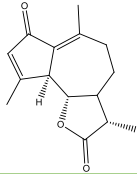
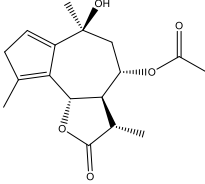
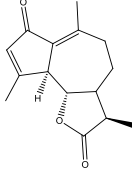
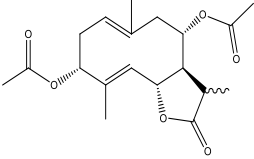
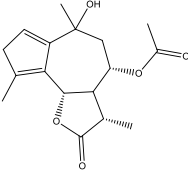
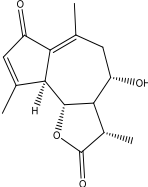


Figura 6: Esquema simplificado para la formación de lactonas de sesquiterpeno de tipo germacraneo, eudesmano y guayano

Las STL representan los componentes más activos de muchas plantas medicinales de la familia Asteraceae. Estos compuestos se obtienen a partir de hojas y flores de las plantas (Castro *et al.*, 2000). Estas moléculas tienen un amplio espectro de actividades biológicas como antiinflamatoria, antitumoral, citotóxica, antibacteriana, antimalaria, actividad neurotóxica, alérgica y antidiabéticas (Seigler, 1998).

Algunas lactonas sesquiterpénicas identificadas son 2,3-dehidro-desacetoximatricina, leucodina, milefina, acetilbalcanólido, aquilicina, achilina, 8-acetoxi-artabsina, desacetilmatricarina (Glasl *et al.*, 2002).

Lactonas sesquiterpénicas		
		
Leucodina	Aquilicina	Achilina
		
Milefina	8-acetoxi-artabsina	Desacetilmatricarina

3.2.2 Biosíntesis de las STL

La vía propuesta para las STL comienza con la ciclación del farnesil difosfato (FDP) a germacreno A por la germacreno A sintasa (GAS). En el siguiente paso, el germacreno A se oxida en su cadena lateral de isopropenilo por una sola enzima citocromo P450, germacreno A oxidasa (GAO), para formar germacra-1 (10), 4,11 (13) -trien-12-ol (GOL), que luego se oxida a germacra-1 (10), 4,11 (13) -trien-12-al (GAL) y germacra-1 (10), 4,11 (13) -trien-12-ácido oico (GAA) (Figura 7). La hidroxilación de GAA en la posición C6- α por la costunolida sintasa (COS) da como resultado un intermedio inestable, 6 α -OH-GAA, que cicla a costunolida, el precursor de los tipos de costunólidos C6-C7 de las lactonas sesquiterpénicas (STL C6-C7).

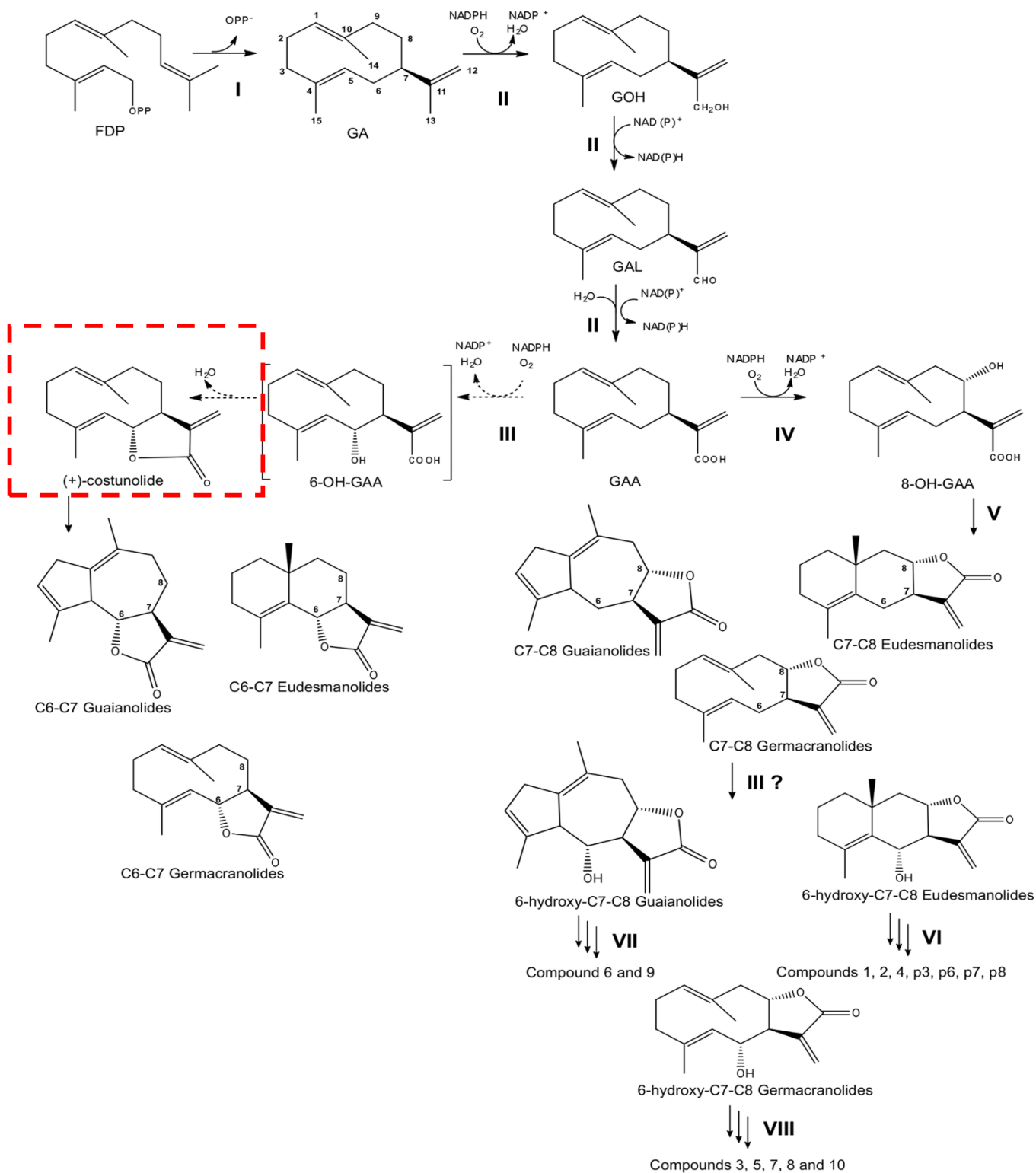


Figura 7. Rutas biosintéticas propuestas para las lactonas sesquiterpénicas C6 – C7 y C7 – C8.

3.3 Botánica de la especie *Achillea millefolium*



Figura 8. *Achillea millefolium* fotografía tomada en el poblado de Tres Marías

Tabla 3. Clasificación de la planta <i>Achillea millefolium</i>	
TAXONOMIA	
Reino	Plantae
Subreino:	Traqueobionta (plantas vasculares)
División:	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase:	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Subfamilia:	Asteroideae
Género:	<i>Achillea</i>
Especie:	<i>Achillea millefolium</i> L.

El género *Achillea* contiene alrededor de 130 especies, que se encuentran en Europa y las zonas templadas de Asia y América, son plantas aromáticas, con variedades ornamentales, a veces con colores rosados como lo son la subespecie *alpestris*, y de color blanca como son las subespecies *millefolium* (flores pequeñas) y *Ceretanum sennen* (flores grandes) (Applequist y Moerman, 2011), que pertenece a la especie cuyo nombre científico es *A. millefolium* (su clasificación se muestra en la tabla 3).

Otros nombres que ha adoptado la planta varían dependiendo de los países en que se encuentre, por ejemplo: en inglés se le llama *yarrow*, *milfoil*, en español se le llama mil hojas, ciento en rama, y en México como plumajillo, plumajo, entre otros (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

3.4 Distribución de *Achillea millefolium*

A. millefolium es una planta asterácea que se distribuye en todo el mundo, pero es originaria de Europa y Asia occidental, crece en las regiones áridas y semiáridas de las latitudes subtropicales y templadas bajas (Mozaffarian, 2009), también está muy extendida en la mayoría de las regiones templadas, como América del Norte (Anne *et al.*, 2006), se encuentra a menudo en pastizales, bosques abiertos, al borde de caminos, en campos de cultivo. La planta comúnmente florece de junio a septiembre (Imtiyaz *et al.*, 2017).



Figura 9. Distribución de la especie *Achillea Millefolium* en México. Fuente: tomada de internet y modificada.

En América del norte principalmente en México *A. millefolium* se ha reportado prácticamente en todo el país principalmente en regiones templadas como: Baja California Norte, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa, 1998).

3.5 Características de la planta

Es una planta perenne herbácea erecta que crece aproximadamente 50-90 cm de altura, su tallo puede ser erguido, simple o a veces ramificado (figura 10), sus hojas se distribuyen uniformemente a lo largo del tallo, son linear-oblongas a lanceoladas, tripinnadas dividida en segmentos finos (de donde se origina su nombre *millefolium*) y miden de 5 a 20 cm de largo, sus inflorescencias son cabezuelas agrupadas en panículas corimbiformes (con las flores más o menos en un plano), densas, pedúnculos de hasta 5 mm de largo, las flores son blancas, aromáticas, ligulada, sus laminas orbiculares a cuadrangulares de 2 a 4 mm de largo, pétalos densamente dispuestos en racimos aplanados. Sus frutos/semillas: el fruto un aquenio, brillante, oblongo a obovado, comprimido, de 2 a 3 mm de largo, glabro (liso), blanco a gris, finamente estriado en forma longitudinal, vilano ausente cuenta con una raíz con estolones y rizomas horizontales (Akram, 2013).

Achillea millefolium es una planta poco exigente en cuanto al terreno de cultivo, puede crecer en acidez del mismo. Aunque se sabe que crece mejor en suelos húmedos que con exceso de agua, pero también puede resistir a la sequía, se adapta a nuevos entornos y puede cambiar su morfología y composición química de manera significativa, las nuevas subespecies evolucionan por poliploidía, se desarrolla bien hasta los 1.000 m altitud (Muñoz *et al.*, 1999). Su reproducción es a través de la semilla cuando la planta se encuentra en plena floración (en los meses de junio a septiembre) y por división de rizomas que se puede realizar durante todo el año. *A. millefolium* se propaga vegetativamente en su estado natural, pero su propagación es demasiado lenta (Turker *et al.*, 2009). Por lo tanto, para superar la velocidad de propagación convencional y abastecer una demanda cada vez mayor de medicamentos basados en plantas, se utilizan técnicas como el cultivo *in vitro* para una producción masiva de la planta (Chaturvedi *et al.*, 2007).



Figura 10. Estructura de la planta de *Achillea millefolium*. Fuente: tomadas de internet.

3.6 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* de plantas se puede definir como el cultivo de células, tejidos, órganos, embriones y plantas enteras, en condiciones asépticas, dentro de recipientes adecuados conteniendo un medio nutritivo y en un ambiente controlado. Se ha aplicado como un método potente para la multiplicación y la conservación de diversas especies de plantas, en comparación con la propagación convencional, el cultivo *in vitro* es independiente de los factores climáticos y edáficos, facilita la multiplicación y obtención de material vegetal de alta calidad, así mismo facilita la clonación de genotipo elite y la optimización de la producción de metabolitos secundarios, mejoran los costos de producción (Castillo, 2004; Shatnawi *et al.*, 2013).

3.6.1 Callogénesis

Un callo es obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una dediferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada que da lugar a una masa amorfa surgida de la proliferación de células del parénquima.

Una de las características importantes del callo, es que presenta diferencias morfológicas las cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular, algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas o con espacios intercelulares, la pigmentación puede ser en todo el callo o en algunas regiones y suelen ser translucidos, verdes, amarillos, cafés etc. por la dependencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etc. Se les denomina callos friables a aquellos cuyas células se separan fácilmente (Lallana y Lallana 2003).

3.6.2 Cultivo de células en suspensión

Las células en suspensión son obtenidas a partir de los callos friables. Las células se separan fácilmente de los callos friables y distribuyen en forma homogénea a través del medio de cultivo y por estar rodeadas del mismo, se facilita la transferencia de nutrientes y oxígeno hacia el citoplasma. Esta suspensión puede utilizarse para generar embriones somáticos (la base de las semillas sintéticas), o puede directamente cultivarse para producir metabolitos secundarios, que son compuestos químicos sintetizados por las células vegetales en

determinadas condiciones, con gran utilidad para las industrias farmacéutica y alimenticia, entre otras (Segretín, 2016).

3.6.3 Cultivo de raíces transformadas

La generación y cultivo de raíces transformadas con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* es otra posibilidad biotecnológica para la producción de metabolitos secundarios de interés, (Rodríguez *et al.*, 2007). Las raíces transformadas se caracterizan por una alta tasa de crecimiento, estabilidad genética y crecimiento en medios libres de hormonas.

3.6.4 Características de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*

Pertenece a la familia *Rhizobiaceae*, es una bacteria de suelo, gram negativa con forma de bastoncillo que no forma esporas, es móvil mediante 1 o 3 flagelos, todas las cepas de *A. rhizogenes* se caracterizan por la presencia de un plásmido inductor de raíz (Ri) de aproximadamente 200 kb que contiene una región de ADN altamente conservada conocida como T-DNA en la que se encuentra un grupo de genes (genes *rol*) implicados en la iniciación y desarrollo de la raíz y genes esenciales para la biosíntesis de opinas (Filetici *et al.*, 1987; Gelvin 2003; Veena y Taylor 2007). Aunque el T-DNA contiene genes de origen bacteriano, estos genes tienen secuencias reguladoras eucarióticas que permiten su expresión en las células vegetales infectadas (Giri y Narasu 2000). Después de la integración del T-DNA en el ADN genómico de la célula vegetal, se expresan enzimas que dirigen la síntesis de derivados de azúcares de aminoácidos inusuales conocidos como opinas, que usa *Agrobacterium* como fuente de nutrientes (Navarrete *et al.*, 2006; Bensaddek *et al.*, 2008; Ozyigit 2012).

Algunas cepas de *A. rhizogenes* poseen un “T-DNA dividido” denominado T-DNA izquierdo (T_L-DNA) de aproximadamente 15–20 kb y T-DNA derecho (T_R-DNA) de aproximadamente 8–20 kb, que puede ser transferido de manera independiente en el genoma de la planta, lo podemos encontrar en las cepas tipo Agropina pRi (pRiA4, pRi1855, pRiHRI, pRi15834, y pRiLBA9402), mientras que las cepas tipo manopina solo transfieren un único T-ADN (T_L-ADN). El T_L-DNA de pRi contiene cuatro genes *rol*, designados como *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD*, y la región T_R específica para la síntesis de opinas y auxinas (Schmulling *et al.*, 1988; Petersen *et al.*, 1989; Gelvin 2003; Bensaddek *et al.*, 2008). En el plásmido Ri, T_L-DNA y T_R-DNA están separados entre sí por al menos 15 kb de DNA (figura 11).

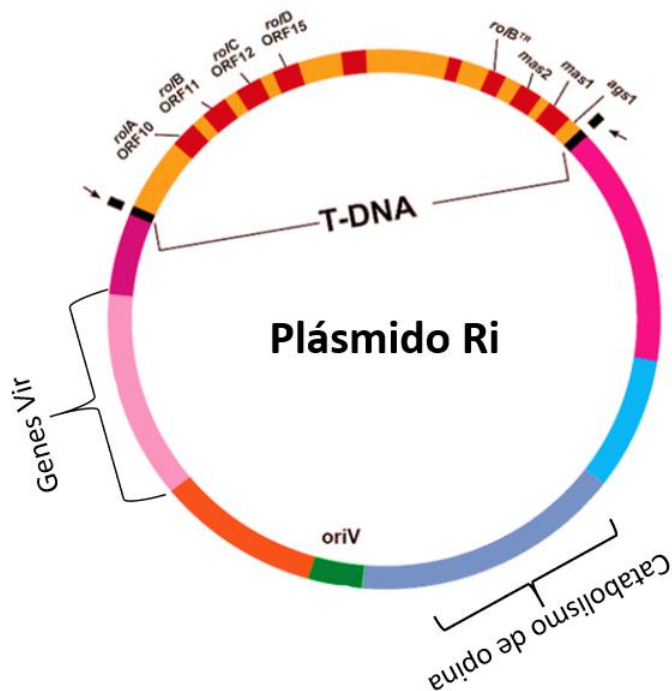


Figura 11. Representación esquemática del plásmido Ri de *A. rhizogenes* (Ozyigit, *et al.*, 2013).

3.6.5 Los genes *rol*

El gen *rolA* se encuentra en todos los plásmidos Ri y codifica una proteína pequeña con una masa molecular de aproximadamente 11 kDa, La longitud de la secuencia del gen *rolA* difiere en varias cepas de *A. rhizogenes* que varían de 279 a 423 pb (Meyer *et al.*, 2000) y se propone que funciona como un factor de transcripción regulador.

El tamaño del gen *rolB* varía entre 765 (cepa 8196) y 840 pb (cepa 2659) y está involucrado en la regulación de la vía de transducción de señales de la auxina y es un potente inductor del metabolismo secundario de la planta (Kiselev *et al.*, 2007).

Las secuencias del gen *rolC* varían en diferentes cepas, pero sus tamaños son similares y van desde 537 pb (cepa 8196) hasta 543 pb (cepa 2659, 1724 y A4). Al igual que *rolB* y el *rolC* tiene la capacidad de estimular la producción de altos niveles de metabolitos secundarios (Bonhomme *et al.*, 2000).

El gen *rolD* se encuentra solo en el TL-ADN de los plásmidos Ri de tipo agropina. También es el único gen *rol* que es incapaz de inducir la formación de raíces por sí mismo ((Mauro *et al.*, 1996). Las mutaciones en *rolD* parecen acentuar el crecimiento del callo dando lugar al inicio de la formación de tumores que se asemeja a la infección con el plásmido Ti (Trovato *et al.*,

1997). Entre las diferentes cepas conocidas de *A. rhizogenes*, K47, K599 y HRI son tipos hiper virulentos que se sabe que son capaces de infectar una amplia gama de plantas hospedadoras.

3.6.6 Mecanismo de transformación

El proceso de transformación consiste en la transferencia de una porción de ADN (T-DNA) del plásmido Ri de *A. rhizogenes* al genoma de la célula vegetal, la secreción de compuestos fenólicos (p.e acetosiringona) producido por heridas en las plantas, conllevan a la activación de los genes *vir* (figura 12). El gen *virA* sintetiza una proteína censora localizada en la membrana de la bacteria, esta proteína tiene actividad autoquinasa, por lo que fosforila a la proteína *virG* activándola, esta proteína se encuentra en el citoplasma y actúa activando la función de los demás genes *vir*, responsables del procesamiento de T-DNA a través del producto de los genes *virD1* y *virD2* que actúan como endonucleasas cortando los bordes del T-DNA, posteriormente *virD2* se une al extremo 5' del T-DNA formando el complejo T-DNA/*virD2*, el cual atraviesa la membrana celular de la planta a través de una estructura de transporte formada por las proteínas *virB* (Fullner *et al.*, 1996), una vez en el citoplasma de la célula vegetal la proteína *virE2* cubre el T-DNA y lo protege de las endonucleasas, cuando el T-DNA, llega al núcleo de la célula huésped, la proteína *virE2* lo dirige hacia la cromatina e inicia su integración en el genoma vegetal, una vez producida la inserción en el genoma de la planta los genes del T-DNA transferido se expresa induciendo a la célula transformada a comportarse como una célula de raíz, sintetizando aminoazúcares (opinas) que son utilizados por la bacteria como nutriente, las raíces inducidas por *A. rhizogenes* tienen la propiedad única de poder crecer *in vitro* sin reguladores exógenos del crecimiento de las plantas (Lee *et al.*, 2001; Rao y Ravishankar 2002).

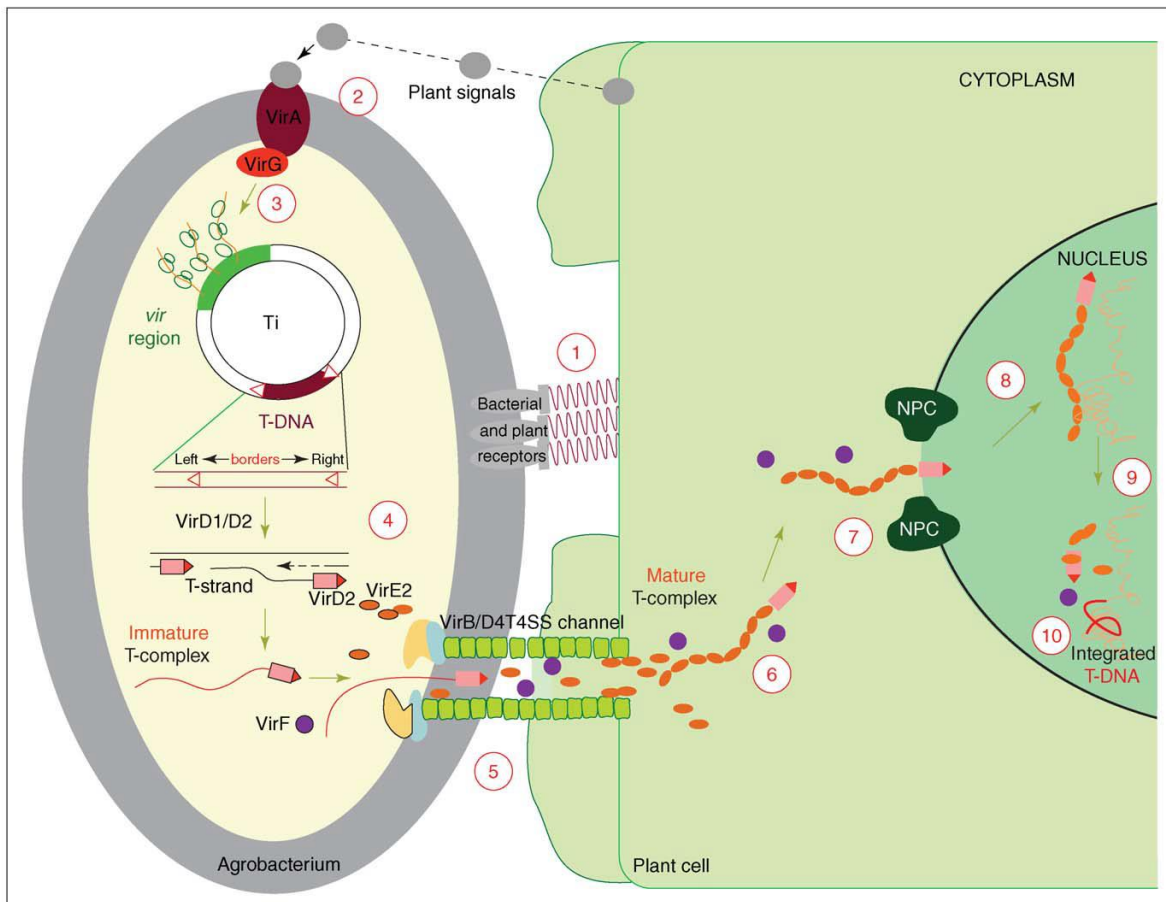


Figura 12. Modelo del mecanismo de transformación genética mediada por *Agrobacterium* (Tzfira y Citovsky, 2006).

3.7 Aclimatación de plántulas

La aclimatización de las plántulas obtenidas en cultivos *in vitro* a condiciones *ex vitro* mejorar la productividad de la planta. El termino aclimatización es empleado para describir el proceso de adaptación a condiciones *ex vitro* inducido y manejado por el hombre, dicho termino suele ser confundido con el termino aclimatación, que hace referencia al proceso de adaptación natural de las plantas, ambos términos tienen el mismo fin, pero difieren sustancialmente en el procedimiento.

Una plántula en condiciones *in vitro*, no desarrolla sus funciones fotosintéticas debido a que la energía la toma del medio de cultivo en el cual se encuentra, es decir, es una planta heterótrofa, ya que no tiene la necesidad de activar su aparato fotosintético para poder capturar el CO₂ y fabricar sus propios asimilatos, para desarrollarse por sí sola. En estas condiciones las plantas desarrollan una anatomía y fisiología diferente a la de las plantas cultivadas en condiciones de campo (Majada *et al.*, 2001).

Es decir que estos cambios afectan a los órganos de la planta, aunque no todos tienen el mismo peso sobre el comportamiento *ex vitro*, las hojas tienen una anatomía interna mal estructurada, con estomas que no cierran normalmente, la cutícula presenta un desarrollo deficiente. Esto hace que las plantas sean más susceptibles al estrés por pérdida de agua, el tallo tiene menor contenido de tejido de soporte (colénquima y esclerénquima) que es la causa para que en condiciones *ex vitro* las plántulas se curven hacia el suelo debido a la fragilidad del tallo, las raíces son poco funcionales y no se desarrollan las raíces secundarias (Molina *et al.*, 2008). Por lo tanto, con la aclimatización se pretende cambiar las condiciones ambientales del cultivo *in vitro*, es decir, reducir los niveles de azúcares, aumentar las intensidades de luz y elevación de los niveles de CO₂, etc. De esta forma las plantas se hacen menos dependientes de las condiciones heterotróficas y comienzan a realizar con mayor efectividad sus funciones fisiológicas para su adaptación (Molina *et al.*, 2008).

3.8 Cultivo *in vitro* de *A. millefolium*

Existen muy pocos informes sobre el cultivo *in vitro* de *A. millefolium* como lo reportado por Figueiredo *et al.*, 1991, Turker *et al.*, 2009, Shatnawi, 2013, donde lograron establecer la obtención de callogénesis, células en suspensión y raíces pilosas, como se muestra en la tabla 4, *A. millefolium* es una planta medicinal que presenta una gran diversidad de compuestos bioactivos, por lo que el cultivo *in vitro* es una estrategia biotecnológica de gran interés para la producción de compuestos bioactivos de suma importancia farmacológica.

Tabla 4. Explante y condiciones para el cultivo *in vitro* de *A. millefolium*.

Tipo de cultivo <i>in vitro</i>	Tipo de Explante	Medio de cultivo	Regulador de Crecimiento mg/L	Condiciones luz/oscuridad	Autor
Organogénesis	raíces	MS	BA-3.0 y AIA-0.5 o KIN-5.0 e IBA-1.0	16 luz /8 h oscuridad	Turker <i>et al.</i> , 2009
	Puntas de brotes y Ápices meristemáticos (20 días de edad)		TDZ-1, AIA 0.5 y GA3-0.5		
		MS	BAP 0.9 a 2.0 mg/L	16 luz /8 h oscuridad	Shatnawi, 2013
Callogénesis y células en suspensión	Segmentos de hojas y tallos	B5	2.4-D 1.5 y Kin-0.1	Oscuridad	Figueiredo <i>et al.</i> , 1991

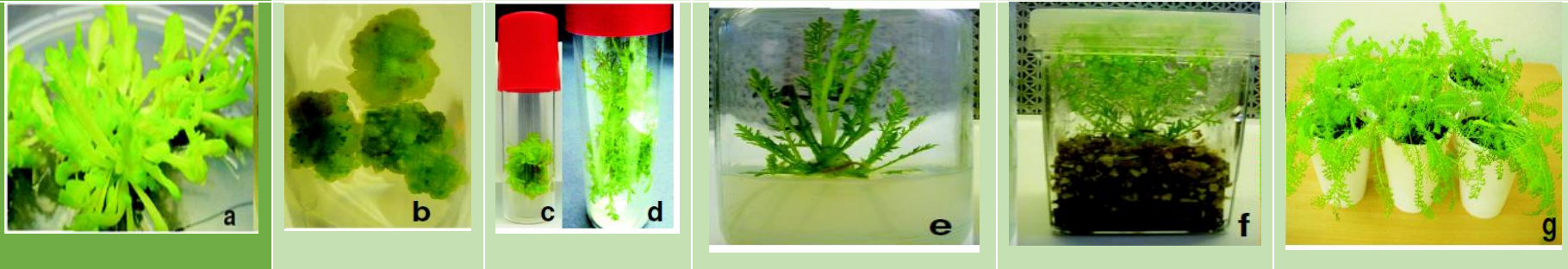


Tabla 4: Imágenes de cultivo *in vitro* de *A. millefolium* (Turker *et al.*, 2009).

4. Compuestos con capacidad vasorrelajante en *Achillea millefolium* L.

Estudios previos realizados en la Facultad de Farmacia de la UAEM en el grupo del Dr. Samuel E. Estrada Soto demostraron la relevancia de *A. millefolium* para la obtención de moléculas bioactivas de interés el área farmacéutica, a continuación, se mencionan algunos de los avances alcanzados:

Arias en el 2015, determinó el efecto vasorrelajante de los extractos; hexánico (EH), diclorometánico (ED), metanólico (EM) e hidroalcohólico (EHA), provenientes de la planta completa de *A. millefolium* en un modelo *ex vivo* de anillos de aorta de rata con y sin endotelio, los resultados demuestran el efecto vasorrelajante del 90% dependiente de la concentración y en presencia de endotelio del EH. Posteriormente Arias en el 2018, aisló 6 fracciones de este extracto y se demostró el efecto relajante de las fracciones en aortas torácicas de rata en presencia y ausencia de endotelio, así como en anillos de tráquea aislada de rata. Del EH activo se logró aislar, purificar e identificar a leucodina (figura 13), una lactona sesquiterpénica, a la que se le atribuye la actividad relajante en anillos de aorta y tráquea (Arias, 2018).

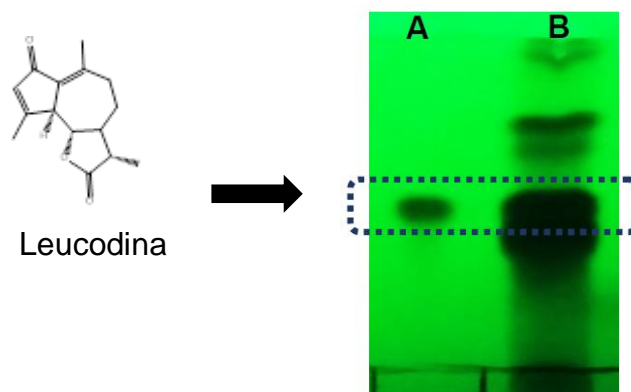


Figura 13: Placa cromatográfica observada en UV **A)** leucodina **B)** extracto hexánico integro (**EHI**), (Arias, 2018) en un sistema hexano/acetato de etilo (60:40).

El EH de *A. millefolium* induce su efecto vasorrelajante a través de un antagonismo de tipo no competitivo hacia los receptores muscarínicos, que involucra la vía NO/GMPc en el proceso de relajación y la disminución de la entrada de Ca⁺⁺ extracelular, mediante el bloqueo de flujo de Ca⁺⁺ hacia el interior de las células del músculo liso e inhibición de la movilización de Ca⁺⁺ de los almacenes intracelulares.

Hernández en el 2018, determinó el efecto relajante (en tráquea) de las diferentes partes que constituyen a la planta medicinal *A. millefolium* y determinó el mecanismo de acción del extracto con mayor actividad farmacológica, los resultados demostraron que los extractos provenientes de flor y raíz se encuentra leucodina y otro compuesto relacionado estructuralmente, y que está en proceso de elucidación estructural (Arias, 2018), teniendo mayor proporción de estos compuestos el EH de raíz en comparación con el EH de flor. Así mismo se observó la presencia de otros dos compuestos (aun no identificados) menos polares que aparecen solamente en el EH de raíz (figura 14-D), posteriormente determinó el efecto relajante en segmentos de tráquea aislada de rata de los extractos orgánicos provenientes de la planta *A. millefolium*, obteniendo que el EH fue el más activo ya que presentó una relajación del 100% del tejido, seguido de los EHA, ED y EM, por lo tanto ellos sugieren que el efecto puede estar mediado por la presencia de los dos compuestos mayoritarios que se han observado en dicho extracto (Hernández, 2018).

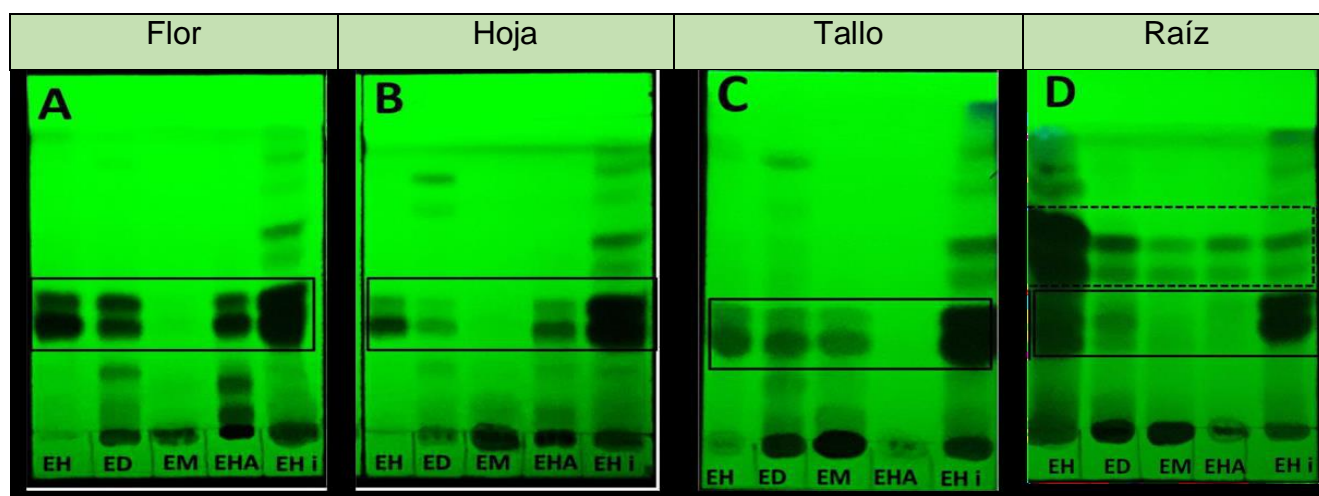


Figura 14: Placas cromatográficas de las diferentes partes de *A. millefolium*. **A)** Flor, **B)** hoja, **C)** tallo, **D)** raíz. En sus diferentes extractos; **EH**, **ED**, **EM**, **EHA** y **EH 1** del 2017, en un sistema hexano/acetato de etilo (60:40). Hernández, 2018

5. JUSTIFICACIÓN

Las lactonas sesquiterpénicas (STL) son un grupo de metabolitos secundarios vegetales con propiedades antihipertensivas y vasorrelajantes, que pueden ser útiles en la generación de fármacos novedosos para el control y el tratamiento de enfermedades crónicas, como la hipertensión arterial. Sin embargo, la producción de metabolitos secundarios a partir de material vegetal puede ser afectada por factores ecológicos, agronómicos e incluso políticos. Por lo que la implementación de sistemas de cultivo de tejidos vegetales, como las raíces pilosas han resultado ser una alternativa eficiente para la producción de compuestos bioactivos de manera controlada.

Muchos de los cultivos de raíces pilosas han demostrado tener estabilidad genética y bioquímica. Además, la presencia de los genes rol en las raíces transformadas tiene un efecto inductor en el metabolismo que estimula la producción de los diferentes metabolitos secundarios, llegando incluso a detectarse metabolitos exclusivos de estos tejidos transformados.

A la fecha no existen reportes en la literatura sobre la identificación de STL en *A. millefolium* en cultivos *in vitro*, y mucho menos sobre el potencial de las raíces pilosas para la identificación de compuestos con actividad vasorrelajante.

6. HIPÓTESIS

Los cultivos *in vitro* y vitroplantas de *Achillea millefolium* tendrán la capacidad de producir lactonas sesquiterpénicas responsables del efecto vasorrelajante.

7. OBJETIVOS

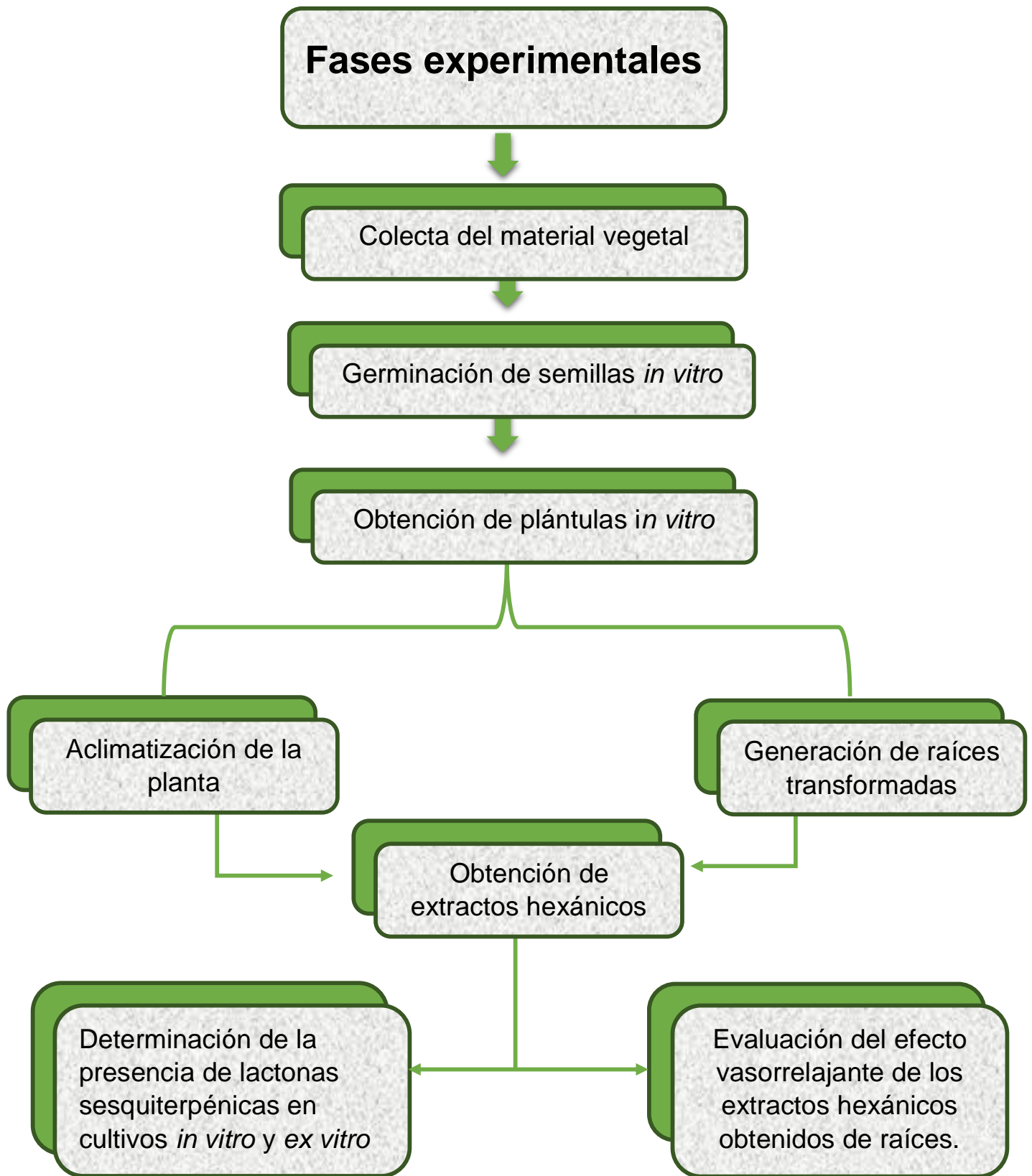
7.1 Objetivo general

Establecer cultivos de raíces pilosas y vitroplantas de *Achillea millefolium* para la identificación de compuestos con actividad vasorrelajantes en un modelo *ex vivo* de aorta aislada de rata.

7.2 Objetivos particulares

- Determinar la eficiencia de transformación de las cepas A4, ATCC-15834 y K599 de *Agrobacterium rhizogenes* para la inducción de raíces pilosas.
- Determinar la presencia de las lactonas sesquiterpénicas a través en cultivos *in vitro* y *ex vitro*.
- Evaluar la capacidad vasorrelajante de los extractos hexánicos obtenidos del cultivo de raíces pilosas en un modelo *ex vivo* de anillos de aorta aislada de rata.

8. Estrategia experimental



MATERIALES Y METODOS

8.1.1 Material vegetal

Achillea millefolium fue colectada en diciembre del 2017 y julio 2018, en el poblado de Tres Marías en el municipio de Huitzilac, límites del estado de Morelos con el estado de México, con coordenadas N 19° 05´ 41. 67´ y 99° 24´ 16. 67´ o a una altitud de 2805 msnm, un ejemplar de la especie fue herborizado y registrado con el número 35768 en el herbario HUMO de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

8.1.2 Extracción de semillas

El material vegetal (parte floral de la planta) fue secado a la sombra a temperatura ambiente por 30 días en bolsas de papel. Posteriormente del secado, las semillas fueron extraídas y colocadas en un frasco de vidrio con tapa.

8.1.3 Desinfección de las semillas

El proceso de desinfección de la semilla se realizó en la campana de flujo laminar. Utilizando una solución de jabón antibacteriano las semillas se enjuagaron, luego se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, y se esterilizan mediante agitación en etanol al 50% durante 10 minutos, enseguida el etanol fue removido con agua destilada estéril, y fueron sumergidas en hipoclorito de sodio comercial (Clorox®) al 3% durante 30 minutos y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (Turker *et al.*, 2009).

8.1.4 Germinación *in vitro* de semillas y desarrollo de plántulas de *A. millefolium*

La germinación de semillas colectadas en diciembre del 2017 se llevó a cabo en frascos de vidrio (tipo Gerber) con tapa de polipropileno estériles conteniendo 20 ml de medio basal Murashige y Skoog (MS, 1962), sin sacarosa, con un pH ajustado a 5.7 ± 0.1 , y como gelificante se utiliza 3 g/L de gelzan™ (medio MS0). El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C por 25 minutos, posteriormente se colocaron 10 semillas esterilizadas por frasco y se incubaron en un cuarto de cultivo a 25 °C con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

Cabe mencionar que se realizaron 3 ensayos de germinación en los meses de marzo, abril y mayo de 2018, se consideró como la semilla germinada cuando la punta de la radícula ha emergido de la cubierta de la semilla, y se dejó de contabilizar hasta el día 20. Una vez que se obtuvieron las plántulas se pasaron a frascos grandes de vidrio de 100 ml conteniendo 30 ml de medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962), semisólido, constituido por el medio MS0

suplementado con sacarosa (30 g/L), el pH, las condiciones de esterilización del medio e incubación de las plántulas fueron las mismas antes mencionadas.

8.1.5 Aclimatización de vitroplantas de *A. millefolium*

Para la aclimatización *ex vitro* se utilizaron 30 plántulas de cultivos *in vitro* de cinco meses de edad (figura 15-A), las cuales fueron extraídas de los frascos de cultivo que las contenían y con agua se les retiro el exceso de medio presente en las raíces. Posteriormente, las plantas fueron sembradas en macetas chicas del número 10 (figura 15-B), que contenía una proporción 3:1 de tierra de monte:vermiculita; previamente esterilizadas en la autoclave a 121 °C por 25 minutos. Para mantener un nivel alto de humedad relativa similar al que fueron expuestas las plántulas durante el cultivo *in vitro*, las plantas fueron cubiertas con una bolsa de plástico transparente soportada por 3 varas de madera de 13 cm de alto y atada al borde de la maceta con una liga (figura 15-C).

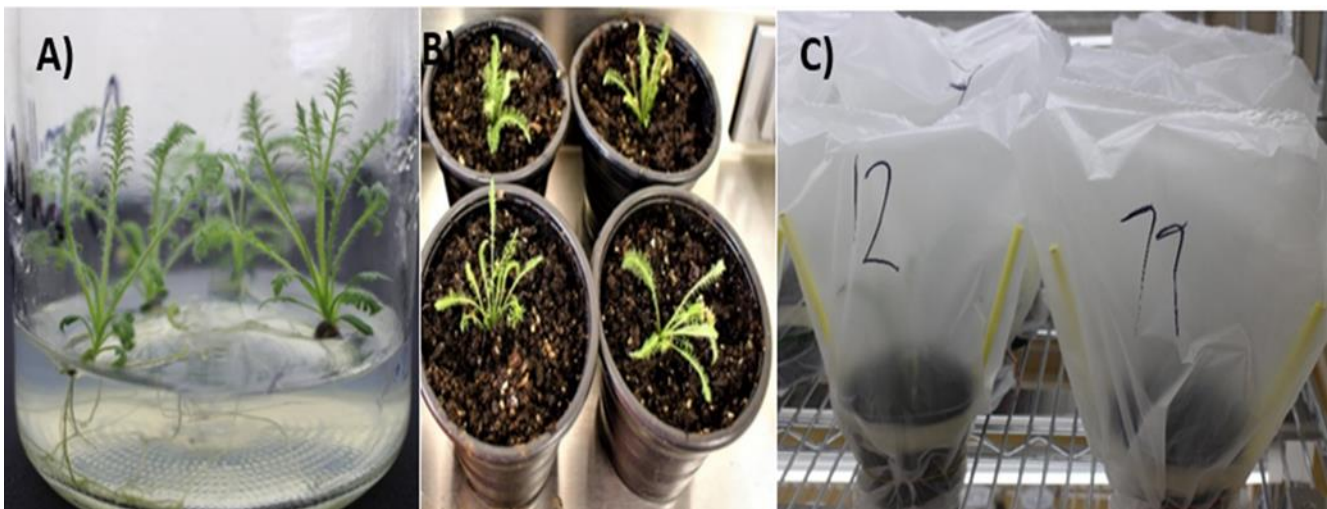


Figura 15: Proceso de aclimatación: **A)** plántulas *in vitro*, **B)** plántulas sembradas en tierra a los 5 meses de edad y **C)** recubrimiento de macetas con bolsas de plástico.

Las macetas fueron colocadas en condiciones de cuarto de cultivo a 25 °C con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, dos veces por semana fueron regadas con agua destilada estéril, semanalmente se les realizó orificios en la parte superior de la bolsa y cada 20 días fueron fertilizadas con 1gr/L de fertilizante universal “Miracle-Gro”, finalmente a los treinta días se les retiró la cubierta plástica y determinó su supervivencia.

8.1.6 Prueba de susceptibilidad de *A. millefolium* a los antibióticos cefotaxima y ceftriaxona

Los antibióticos cefotaxima y ceftriaxona son empleados para eliminar a *A. rhizogenes* del material vegetal inoculado y pueden afectar la viabilidad de la célula vegetal, es por ello, que con la finalidad de determinar si estos antibióticos afectan los tejidos de *A. millefolium* se evaluó el efecto combinado de la aplicación de ambos a 300, 400 y 600 mg/L en plántulas de 9 días de edad. Para ello, fueron colocadas 5 plántulas por caja Petri que contenían medio semisólido MS adicionado con iguales concentraciones de antibióticos, como control se empleó medio basal MS sin antibióticos. Los cultivos se incubaron a 25 °C en oscuridad, se realizaron 4 tratamientos y 3 repeticiones de cada uno, para un total de 12 unidades experimentales (cajas Petri). Una vez realizado el ensayo, se tomaron los datos de porcentaje de oscurecimiento (fenolización) o muerte de la plántula durante un periodo de 4 semanas.

8.1.7 Condiciones de cultivo de las cepas de K599, ATCC15834 y A4 de *A. rhizogenes*

Para la inducción de raíces pilosas de *A. millefolium* se evaluó la eficiencia de transformación de las cepas K599, ATCC® 15834™ y A4 de *A. rhizogenes*. La cepa K599 fue sembrada en medio Luria-Bertani (LB: 20 g/L bacto-triptona de caseína, 5 g/L extracto de levadura; 20 g/L cloruro de sodio y 17 g/L agar bacteriológico) y las cepas ATCC15834 y A4 fueron crecidas en medio YEM (Extracto de Levadura-Manitol-agar; 0.4 g/L extracto de levadura; 10 g/L cloruro de sodio; 0.5 g/L agar bacteriológico; 0.1 g/L manitol y 12 g/L fosfato dibásico de potasio), el pH del medio de cultivo fue ajustado a 7.0 ± 0.2 previa esterilización en autoclave a 121 °C por 20 minutos y vertidos en las cajas Petri en condiciones de esterilidad proporcionadas por una campana de flujo laminar (veco). Los cultivos de las cepas K599 y A4 se colocaron en la incubadora a 28 °C por 24 hrs y la cepa ATCC15834 por 48 hrs, una vez crecidas las cepas fueron guardadas en el refrigerador hasta su uso.

8.1.8 Inducción de raíces pilosas de *Achillea millefolium* mediante la transformación con *A. rhizogenes*

Durante el desarrollo de este ensayo se llevaron a cabo tres diferentes métodos de inoculación de las cepas de *A. rhizogenes* para la inducción de raíces pilosas. A continuación, se describen los explantes y condiciones para la infección de las bacterias.

8.1.8.1 Método I

Explante: 150 hojas obtenidas de plántulas de tres meses de edad, cada una con un corte recto en la base y el ápice de la lámina foliar realizado con un bisturí estéril. Bacteria: las cepas de K599, ATCC15834 y A4 de *A. rhizogenes* fueron cultivadas en medio líquido por 24 hrs.

Condiciones de inoculación y cocultivo: Los explantes de hoja fueron sumergidos durante 1 minuto en la suspensión bacteriana, posteriormente cada explante fue colocado en cajas Petri con medio basal MS e incubados a 25 °C en oscuridad durante 48 hrs. Se emplearon 50 explantes por cepa bacteriana.

Eliminación de la bacteria y condiciones de cultivo: Luego del cocultivo, la bacteria fue removida de los explantes a través de 3 lavados con abundante agua estéril, cada uno de 5 minutos. Enseguida los explantes se colocaron sobre papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua, se transfirieron a medio semisólido MS con antibióticos y fueron incubados a 25°C en oscuridad. La formación de raíces pilosa fue documentada durante 4 semanas.

8.1.8.3 Método II

Explante: 150 plántulas *in vitro* de nueve días de edad.

Bacteria: las cepas de K599, ATCC15834 y A4 de *A. rhizogenes* fueron cultivadas en medio semisólido durante 48 hrs.

Condiciones de inoculación y cocultivo: La inoculación de los explantes se realizó empleando un bisturí impregnado de la bacteria con el que se hizo un corte en la base de la plántula (entre el hipocótilo y la raíz). Los explante inoculados fueron colocados en cajas Petri con medio MS semisólido, y se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 48 hrs. Se emplearon 50 explantes por cepa bacteriana.

Eliminación de la bacteria y condiciones de cultivo: después del cocultivo los explantes fueron transferidas a medio MS con antibióticos. La formación de las raíces pilosa fue documentada durante 4 semanas de cultivos a 25°C en condiciones de oscuridad.

8.1.8.3 Método III

Explante: doce plántulas de tres meses de edad.

Bacteria: las cepas de K599, ATCC15834 y A4 de *A. rhizogenes* fueron cultivadas en medio líquido durante 24 hrs. La densidad óptica (D. O_{600nm}) del cultivo bacteriano fue determinada y se realizaron diluciones hasta alcanzar una D.O de 0.3 y 0.5 para cada cepa.

Condiciones de inoculación y cultivo: por cepa bacteriana se emplearon 4 plántulas que fueron heridas en el tallo con una jeringa para insulina de 1 ml y sobre las heridas fue colocada una gota de las diluciones bacterianas. Enseguida cada plántula fue colocada en frascos de vidrio de 200 ml estériles, que contenían 50 ml de medio basal MS y se incubaron a 25°C en condiciones de fotoperiodo (16h luz: 8h oscuridad). La formación de las raíces pilosa fue documentada durante 4 semanas.

En todos los ensayos se siguió el mismo procedimiento para cada método empleando el medio de cultivo como control de inoculación.

8.2 Selección de líneas de raíces pilosas

Las raíces obtenidas de los explantes infectados con las cepas de *A. rhizogenes* A4, ATCC-15834 y K599 que mostraron mayor crecimiento fueron individualizadas en cajas Petri con medio MS semisólido adicionado con antibióticos y se incubaron a 25°C en oscuridad. Cada 20 días se realizaron subcultivos de las raíces en las mismas condiciones descritas previamente. Después de varios subcultivos, las raíces que no mostraron crecimiento de la bacteria fueron trasferidos a medio basal MS.

Para distinguir cada una de las líneas seleccionadas se asignaron códigos, iniciando por el explante del cual se generó (hoja sumergida (Hs), plántula de 9 días (P9-d) y planta completa (Pc)), seguido por el número del explante E1-E4 para plantas de tres meses de edad y E1-5 para hoja y plántulas de 9 días, número de caja de C1-C10 para hoja y plántulas de 9 días y

número de frasco F1-F4 para plantas de tres meses de edad y el número de raíz seleccionada del explante (R1-R10).

8.2.1 Confirmación de raíces transformadas

La naturaleza transgénica de las raíces obtenidas por la infección de la cepa de *A. rhizogenes* ATCC-15834 se confirmó a través de la expresión del gen *tdt* que codifica para la proteína roja fluorescente, el gen *tdt* se encuentra contenido en el plásmido pTDT presente en la cepa ATCC-15834 (Valdés *et al.*, 2008). La fluorescencia de la proteína se detecta en las raíces empleando un microscopio de epifluorescencia bajo luz verde y filtro rojo.

Así mismo se llevó a cabo la corroboración genética de las 5 líneas de raíces pilosas seleccionadas, mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional la detección de los genes *rolA*, *rolB* *rolC*, contenidos en el T-DNA inserto en el genoma de la raíz. Y se descartó la presencia de la bacteria en las raíces transformada empleando el gen *virD2*, que no es transferido en el T-DNA bacterial. En la Tabla 5 y 6 se presentan las condiciones de temperatura y los oligonucleótidos a utilizados, la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25µl por reacción, cada reacción contenía 16.4µl de H₂O (Nuclease-Free Water), 1.5µl de MgCl (25mM), 1.25µl de cada oligonucleótido (forward y reverse (100 µM)), 2.5µl de buffer 10X, 1µl de dNTPs (10mM), 0.125µl de Taq polimerasa y 1µl de ADN genómico, se utilizó como control negativo el ADN de la planta *in vitro* de *A. millefolium* y como control positivo el ADN de las bacterias en uso (A4 y ATCC-15834). El producto de la PCR fue visualizado en una electroforesis en agarosa al 1% por tinción con bromuro de etidio.

El proceso de extracción de ADN consistió de la siguiente manera:

Se inició con 100 miligramos de tejido fresco proveniente de raíces y planta *in vitro*, posteriormente fue macerado con nitrógeno líquido, enseguida se le añadió un buffer de extracción 2% CTAB (20 mM de EDTA ph 8.0, 100 mM Tris-HCl ph 8.0, 1.4 M de NaCl, 1% PVP y 0.2% de 2-mercaptoethanol). Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 60 °C en baño María y se mezcló por inversión 10 min. Se adiciono 750 µl de la solución fenol-cloroformo-alcohol isoamilico en una reacción 25:24:1, se mezcló usando el vortex y fue centrifugado a 15,000 revoluciones por minuto (rpm) a 4 °C durante 1º minutos (protocolo modificado de Moyo *et al.*, 2008).

<i>Oligonucleótidos</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tamaño del amplicon</i>
<i>Rol A</i>	Forward: CGTTGTCGGAATGGCCCAGACC Reverse: CGTAGGTCTGAATATTCCGGTCC	248 pb
<i>Rol B</i>	Forward: ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA Reverse: TTAGGCTTCTTTCATTTCGGTTTACTGCAGC	780 pb
<i>Rol C</i>	Forward: ATGGCTGAAGACGACCTGTGTT Reverse: TAGCCGATTGCAAACCTGCAC	490 pb

Tabla 5: Secuencia y tamaño del amplicon de los oligonucleotidos *rol A*, *rol B* y *rol C*.

GEN	Condiciones de amplificación
<i>rol A</i>	Desnaturalización inicial 5 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 53 °C y 5 minutos de extensión a 72 °C.
<i>rol B</i>	
<i>rol C</i>	Desnaturalización inicial 5 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 50 °C y 5 minutos de extensión a 72 °C.

Tabla 6: Condiciones de amplificación del PCR para los genes para cada uno de los oligonucleotidos *rol A*, *rol B* y *rol C*.

8.2.2 Evaluación de la tasa de crecimiento de las líneas de raíces pilosas

La tasa de crecimiento de las líneas de raíces pilosas se determinó tomando como inóculo inicial 2.0 gr de raíces en peso fresco (PF) en 50 ml de medio MS contenido en frascos de 200 ml con tapa hermética. Después de 20 días de cultivo a 25 °C en oscuridad fue determinado el PF de las raíces.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, realizando un análisis de varianza y pruebas de medias de Tukey, considerando un nivel de significancia de 0,05.

El índice de crecimiento (IC) se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$IC = \frac{\text{peso fresco final} - \text{peso fresco inicial}}{\text{peso fresco inicial}}$$

8.2.3 Preparación de los extractos

El material vegetal seco y molido se sometió a un proceso de maceración exhaustiva con hexano, en una proporción solvente:muestra 10:1, durante 72 horas por triplicado, posteriormente, el material vegetal fue retirado del disolvente por filtración y posteriormente el extracto se llevó a la sequedad a través de una campana de extracción.

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{DXD}{LXL} \cdot 100$$

DXD= peso seco del extracto final, LXL: peso seco del material biológico con el que se inició el extracto.

8.2.4 Identificación de lactonas sesquiterpénicas

La identificación de las lactonas sesquiterpénicas se realizó a través de cromatografía en capa fina (TLC) utilizando una mezcla de hexano:acetato de etilo en la proporción de 65:35 v/v como fase móvil y placas de gel de sílice fase normal como fase estacionaria, siguiendo la metodología reportada por Arias en el 2017 (tesis de maestría, 2017).

8.3 Evaluaciones farmacológicas

8.3.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado entre 250 y 300 g con un libre acceso a agua en condiciones de bioterio de la Facultad de Farmacia UAEM.

8.3.2 Obtención de la aorta torácica de rata

Para la obtención de los segmentos de aorta, los animales fueron sacrificados en una cámara de éter etílico, posteriormente, se realizó la disección abdominal para extraer la aorta torácica la cual se limpió de manera cuidadosa de tejido conectivo, con el fin de evitar daño al tejido muscular y endotelial, una vez que la aorta se encontraba limpia fue cortada en segmentos de aproximadamente 3 mm, los cuáles se colocaron en 10 ml de solución Ringer-Krebs [(mM) NaCl (189), glucosa 11.4, NaHCO₃ (25), KCL (4.7), MgSO₄ (1.2), KH₂PO₄ (1.2), EDTA (0.026), CaCl₂ (2.5)], a pH 7.4 y con un burbujeo constante de una mezcla gaseosa O₂/CO₂ (95:5%), la solución se mantuvo a 37 °C, con un baño recirculado.

8.3.3 Sistema de determinación del efecto vasorrelajante (registro de datos).

Se determinó el efecto vasorrelajante, sobre los anillos de aorta, cada anillo fue colocado en la cámara de incubación, unida por un lado con ayuda de un gancho al extremo de la cámara y por otro lado a un transductor de fuerza Grass modelo 03 el cual emite los registros, y posteriormente, los envía a un polígrafo BIOPAC systems UIM 100C.

Los segmentos de la aorta fueron sometidos a una tensión basal de 3g de fuerza y se dejaron por un periodo de estabilización aproximado de 30 minutos. Posteriormente, el tejido fue sensibilizado durante 15 minutos con Noradrenalina (NA) 0.1 μM a intervalos de 30 minutos (por triplicado). Después de cada estimulación, el tejido se lavó con solución de Krebs, para recuperar el nivel basal de la tensión. La presencia de endotelio en cada tejido fue confirmada mediante la adición de carbacol 1 μM , antes del último lavado en la tercera contracción.

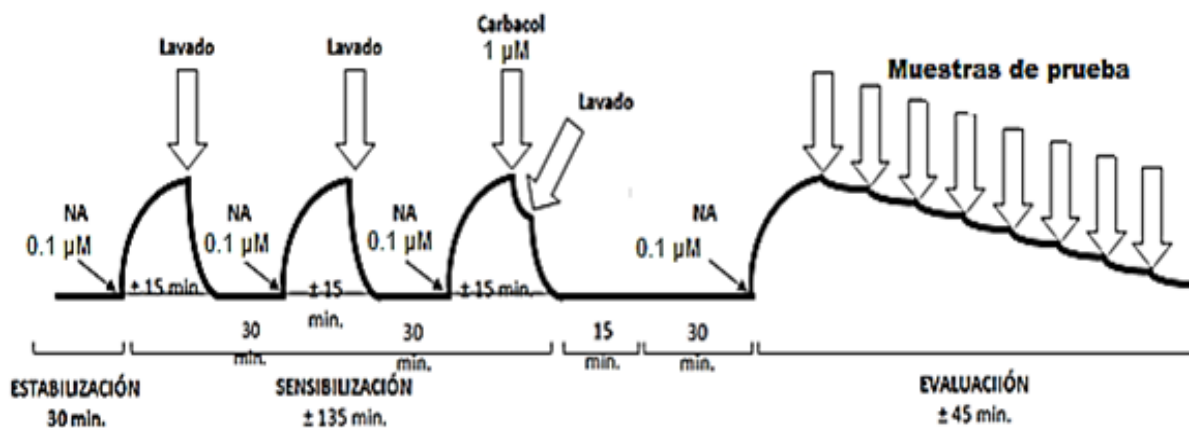


Figura 16. Sistema de evaluación del efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos de raíces pilosas de *Achillea millefolium*.

8.3.4 Evaluación del efecto vasorrelajante

El tejido previamente sensibilizado fue puesto en contacto con concentraciones de los extractos provenientes del cultivo de raíces pilosas. Posteriormente, se realizó un análisis de ANOVA $p < 0.005$.

RESULTADOS

9.1 Germinación de semillas de *Achillea millefolium*

Las semillas colectadas en 2017 tienen un tamaño que oscila entre los 2 y 3 mm de largo, son de color marrón claro/blanquecino en su estado inmaduro (figura 17-B) tornándose a un color marrón oscuro al madurar. En la figura 17 se presentan imágenes de la inflorescencia y semillas colectadas.

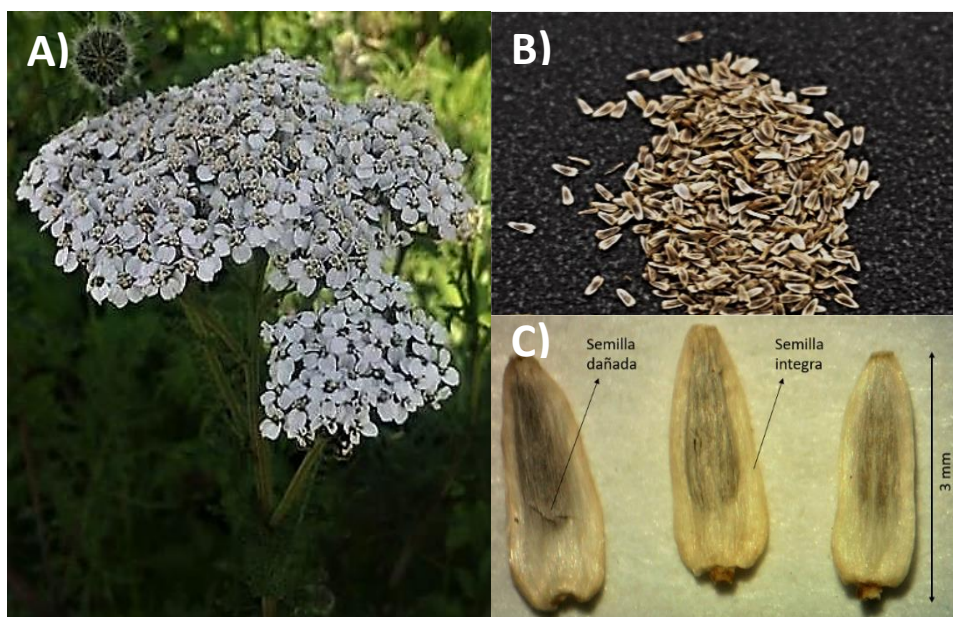


Figura 17: **A)** parte floral de la planta *A. millefolium* (fotografía tomada en el poblado de Tres Marías estado de Morelos), **B)** semillas **C)** semilla observada bajo estereoscopio.

La germinación *in vitro* se inicia con la hidratación de los tejidos de la semilla durante los primeros dos días de cultivo (figura 18-A), una vez que la semilla se ha hidratado se activa su metabolismo, y se observa la emergencia y crecimiento de la radícula a través de las cubiertas seminales (figura 18-B) durante el tercer día, e inicia el alargamiento y erección del hipocótilo hacia la superficie (figura 18-C), así como el desarrollo y la expulsión de las hojas cotiledónares (figura 18-D), posteriormente se empiezan a formar los pelos radiculares y los cotiledones se abren (figura 18-E), dando paso a la formación de la raíz primaria (figura 18-F) y al crecimiento de la plúmula o gémula, que originan el primer par de hojas verdaderas (figura 18-G), el desarrollo de las raíces secundarias seguirá para darle sostén a la planta en etapa adulta, las primeras hojas se expanden y los cotiledones se marchitan y caen, el proceso

concluye alrededor del día 20 en condiciones *in vitro*. En la figura 19 se presenta una plántula de dos meses de edad.

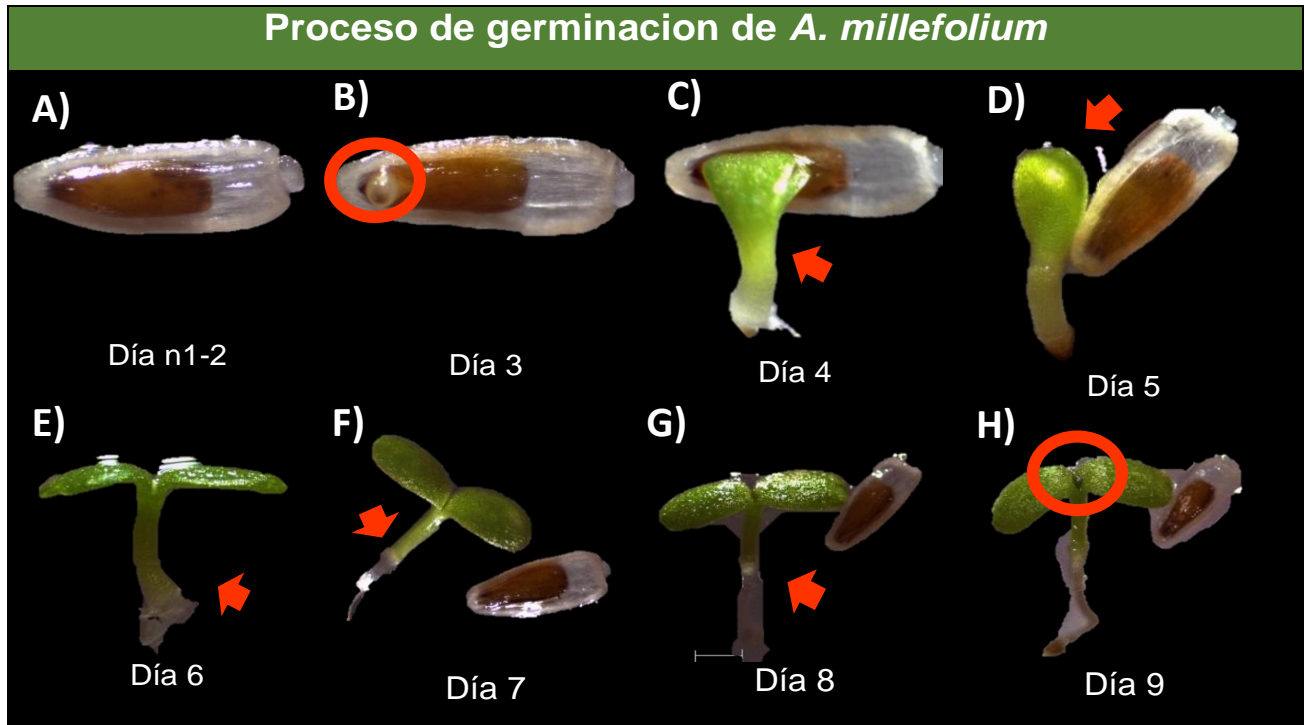


Figura 18: Proceso de germinación de la semilla de *A. millefolium* a través del microscopio.



Figura 19: Plántula de 2 meses de edad.

Los resultados obtenidos de los tres ensayos realizados indican que el 47 % de las semillas logran germinar durante los 20 días de observación (Tabla 7).

Fecha de cultivo	N. de semillas	Porcentaje de germinación (Media ± DS)
05-03-2018	270	(47 ± 1.8)
13-04-2018	390	(47 ± 1.7)
26-05-2018	390	(47 ± 1.3)

Tabla 7: Porcentaje de germinación de semillas de *A. millefolium* colectadas en el 2017 en el poblado de Tres Marías del estado de Morelos.

9.3 Obtención de plántulas *in vitro* a *ex vitro*

Con el proceso empleado para la aclimatización de 30 plántulas germinadas *in vitro* se alcanzó la supervivencia del 86.66% de ellas. Las vitroplantas fueron capaces de superar los cambios de condiciones *in vitro* (figura 20-A) a *ex vitro* (figura 20-B). Las plantas en maceta continuaron su crecimiento y desarrollo en condiciones autótrofas, donde se observó la formación de nuevas hojas de apariencia vigorosa y flores a los 5 meses de cultivo (Figura 21).

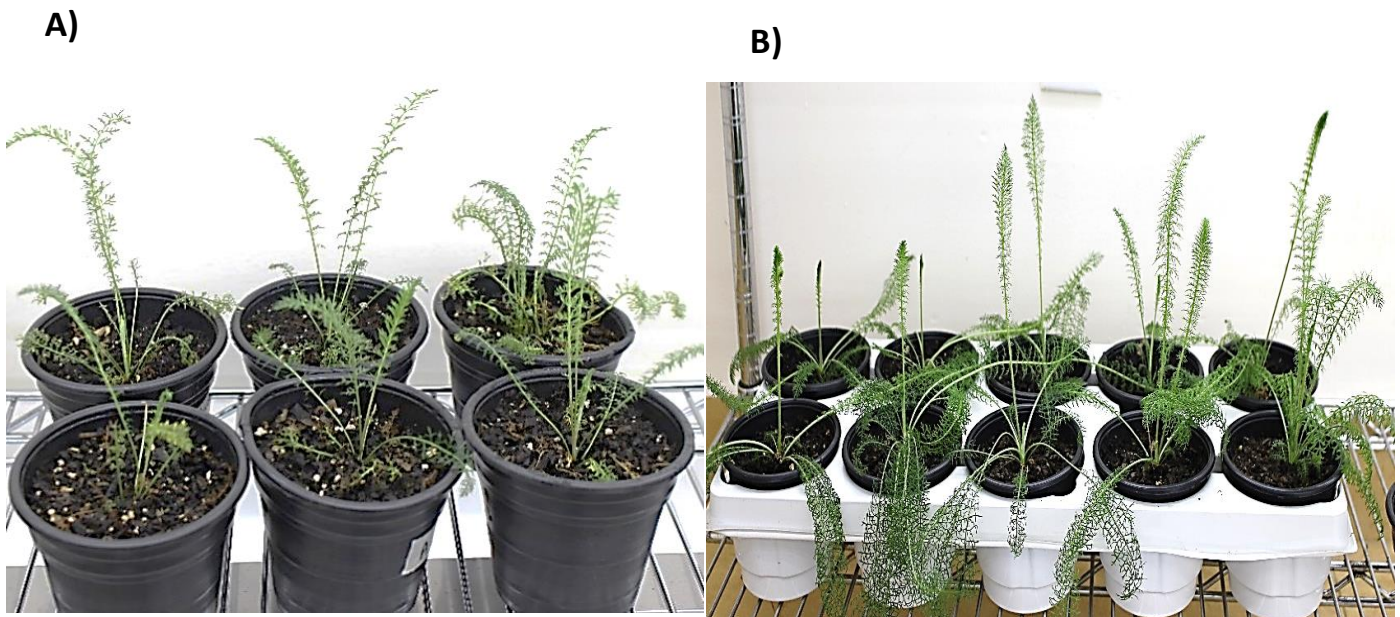


Figura 20: **A)** Plántulas recién sembradas en tierra, **B)** plantas con un mes pos-aclimatación



Figura 21: Planta con meses pos-aclimatación, presentando las primeras inflorescencias

9.3 Prueba de susceptibilidad con dos antibióticos en explantes de *Achillea millefolium*

La prueba de susceptibilidad consiste en evaluar el efecto de 300, 400 y 600 mg/L de ceftriaxona y cefotaxima en plántulas de 9 días de edad. Las plántulas fueron observadas durante 3 semanas posteriores al contacto con el antibiótico. En las primeras dos semanas, en ninguno de los tratamientos las plántulas mostraron cambios en el color (signos de fenolización u oxidación) o morfología, sin embargo, en la tercera semana se observó ligeras zonas de daño (oscurecimiento) en las hojas de las plántulas expuestas a concentración más alta de antibióticos (600 mg/L) (figura 22-D).

Esto prueba que las altas concentraciones de ceftriaxona y cefotaxima no afectan ni inhiben el crecimiento de la planta ya que presenta poca presencia de daño oxidativo, probablemente los explantes se adaptaron al estrés provocado, por lo que el uso de antibióticos a la mayor

concentración (600 mg/L) es seguro para eliminar de *A. rhizogenes* después de la infección de los explantes sin causarles daños mayores al explante, sin embargo, se decidió utilizar la concentración de 400 mg/L para eliminar la bacteria y disminuir el efecto de estrés de los explantes utilizados.

A) Medio basal MS



B) Medio basal MS+ 200 mg/L de Cef y Ceft



C) Medio basal MS+ 300 mg/L de Cef y Ceft



D) Medio basal MS+ 600 mg/L de Cef y Ceft

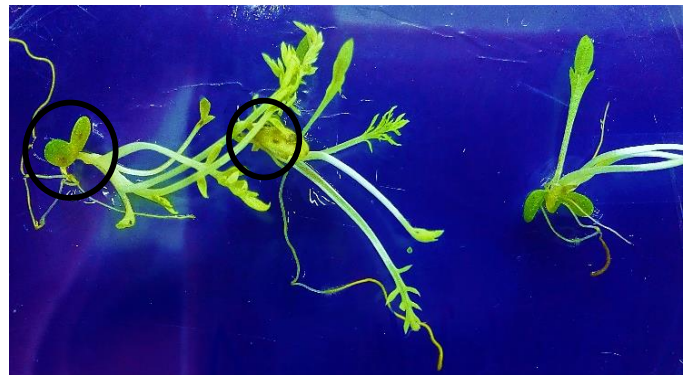


Figura 22. Plántulas en medio basal MS adicionado con 200, 300 ó 600 mg/L de los antibióticos cefotaxima (Cef) y ceftriaxona (Ceft) después de 3 semanas de cultivo.

9.4 Obtención de raíces transformadas por *A. rhizogenes*

La inoculación de las cepas A4, K599 y ATCC15834 en plántulas, hojas e hipocótilos permitió la obtención de raíces pilosas. El tiempo de respuesta del explante fue diferente con los tres métodos evaluados, siendo el método II el más rápido en la formación de raíces, las primeras raíces se observaron a 10 días post inoculación. En el método III las raíces se observan hasta el día 15 y en el método I hasta el día 20. Los controles negativos de los tres métodos evaluados no presentaron formación de raíces..

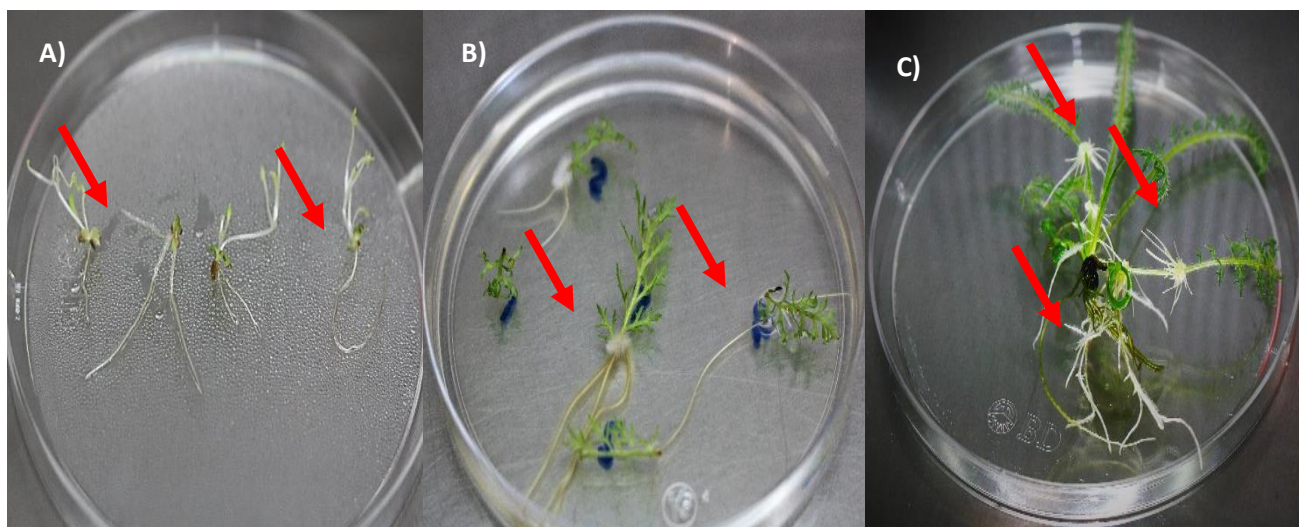


Figura 23: Explantes de *A. millefolium* infectados con las cepas A4, ATCC-15834 y K599 de *A. rhizogenes*. A) Método I; B) Método II y C) Método III.

La mayor eficiencia de transformación observada fue del 80%, empleando el método III para la inoculación de las cepas A4 y ATCC15834, como se muestra en las tablas 8A, 8B, 8C, cabe mencionar que para la cepa K599 se realizaron dos ensayos adicionales (aparte de los ya mencionados) modificando la concentración de la bacteria inoculada con el método I, el cultivo bacteriano se creció hasta alcanzar la DO600nm de 0.3, 0.5 y 0.7, sin embargo, tampoco se logró obtener raíces transformadas por esta cepa. Las raíces presentaron una morfología típica de raíces transformadas con ramificaciones laterales, crecimiento radicular plagiotrópico y abundantes pelos radicales.

En total se lograron individualizar 469 raíces de los tres ensayos realizados, de estas se seleccionaron 15 raíces de rápido crecimiento producto de la infección con cada una de las cepas, se observó su crecimiento y ausencia de la bacteria.

Después de 2 meses de cultivo quedando en total de 13 líneas para la cepa ATCC15834, 2 líneas de raíces para el explante de plántulas de 9 días y 11 líneas de raíces para el explante de hoja, para la cepa A4 un total de 8 líneas, 1 línea de raíces para plántulas de 9 días, 7 líneas de raíces para el explante de hoja, resultando mejor el método por sumergido por hoja de tres meses, ya que finalmente las raíces provenientes de este método son las que mayor crecimiento mostraron quedándonos con 18 líneas en total, las cuales fueron utilizadas para los ensayos siguientes:

Cepa de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Eficiencia de transformación	Número de Raíces individualizadas	Raíces con crecimiento estable
ATCC15834	38%	31	2
A4	40%	106	1
K599	0	0	0

Tabla 8-A: Método I, mostrando eficiencia de transformación, N° y crecimiento estable de raíces.

Cepa de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Eficiencia de transformación	Número de Raíces individualizadas	Raíces con crecimiento estable
ATCC15834	38%	71	11
A4	74%	78	7
K599	0	0	0

Tabla 8-B: Método II, mostrando eficiencia de transformación, N° y crecimiento estable de raíces.

Cepa de <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Eficiencia de transformación		Número de Raíces individualizadas		Raíces con crecimiento estable	
	0.3	0.5	0.3	0.5	0.3	0.5
ATCC15834	80%	80%	27	68	0	0
A4	80%	20%	61	27	0	0
K599	0	0	0	0	0	0

Tabla 8-C: Método III, mostrando eficiencia de transformación, N° y crecimiento estable de raíces.

9.5 Confirmación de transformación de las raíces mediante epifluorescencia.

Dieciocho líneas provenientes de la cepa ATCC-15834 fueron evaluadas bajo el microscopio de epifluorescencia. La fluorescencia en el 50% de las raíces evaluadas nos indica la transferencia satisfactoria del gen *tdt* contenido en el plásmido (pTDT), demostrando la transformación de las raíces (Figura 24).

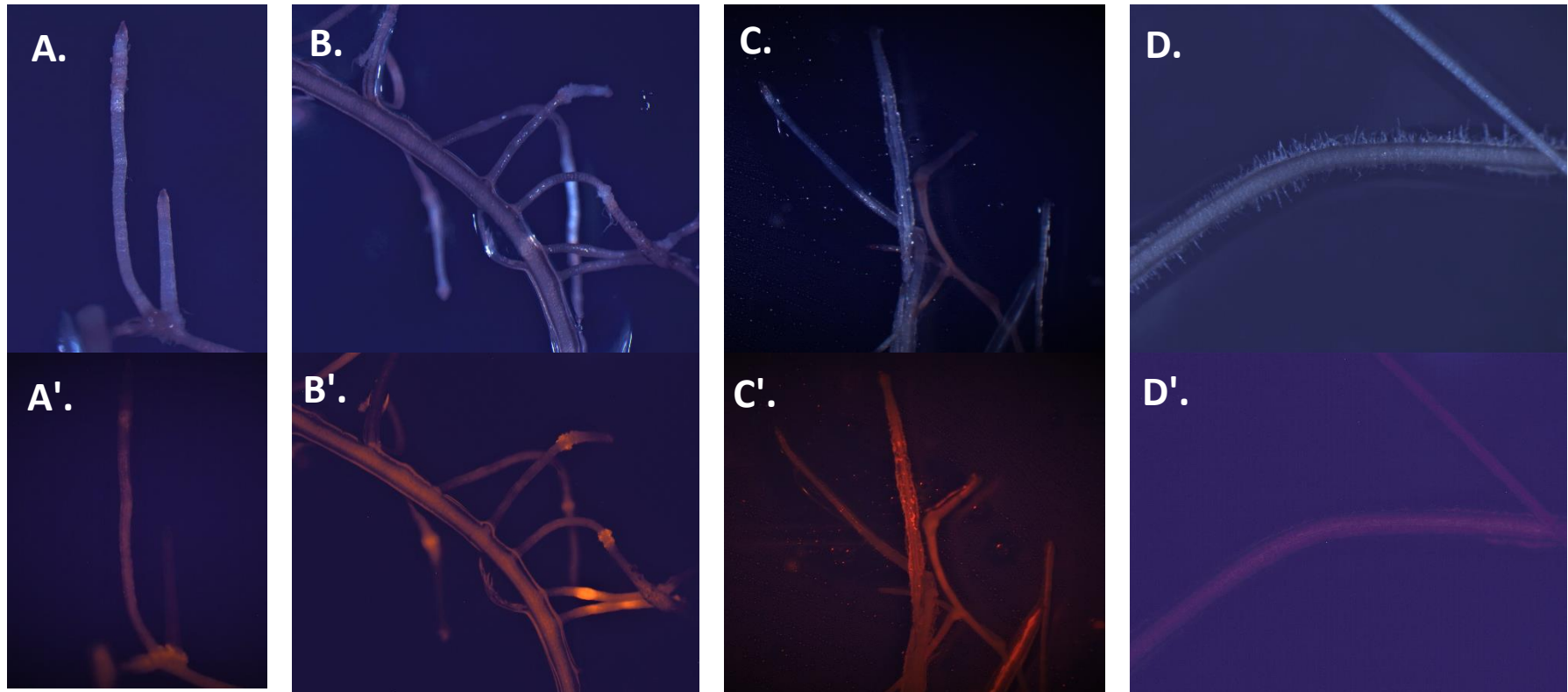


Figura 24: Raíces provenientes de explante de hoja observadas bajo microscopio de epifluorescencia. Se presentan las imágenes de las raíces observadas con luz blanca en los paneles A - D y la expresión de la proteína rojo fluorescente de las mismas raíces en A' - D'.

Con la finalidad de corroborar la transformación de las raíces obtenidas y seleccionadas para este proyecto, se llevó a cabo la corroboración de la integridad del ADN de las raíces pilosas, a través de una electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la imagen siguiente.

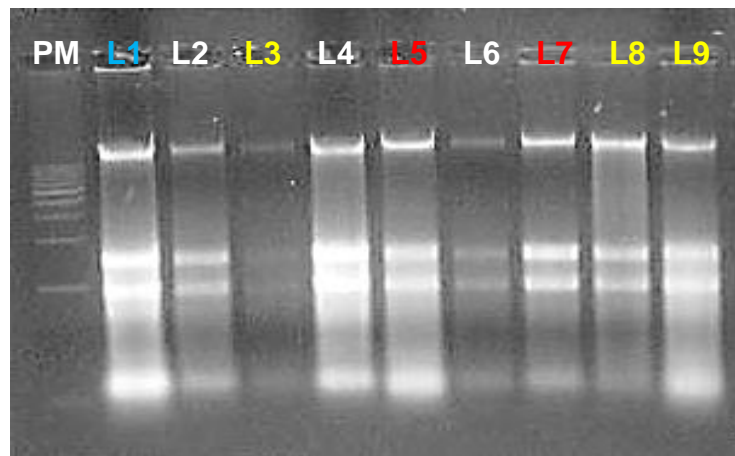


Figura 25: Electroforesis en gel de agarosa, carriles 1-PM, 2- DNA de planta integra, del carril 3 al 10 se muestra el ADN de las raíces pilosas, marcado con rojo las raíces provenientes de la cepa A4 y con amarillo las raíces provenientes de la cepa ATCC-15834 (líneas que se usaron para este proyecto).

Posteriormente se siguió con el análisis molecular PCR convencional para confirmar la transferencia satisfactoria de los genes *rol A*, *rol B* y *rol C* de la bacteria *A. rhizogenes* en las 5 líneas de raíces, como se puede observar en la imagen 26 no se logró la amplificación de dichos genes *rol* para las distintas líneas de raíces pilosas, sin embargo podemos observar la amplificación de los genes en los controles (ADN de las cepas A4 y ATCC-15834), lo cual nos podría estar indicando que hay factores que están interviniendo para no lograr una amplificación satisfactoria, como podría ser la mala calidad del ADN, quizá por tener algún residuo de los diferentes compuestos que se utilizaron en la extracción (fenol, etano, cloroformo, isopropanol, etc.) que pudieran estar interviniendo.

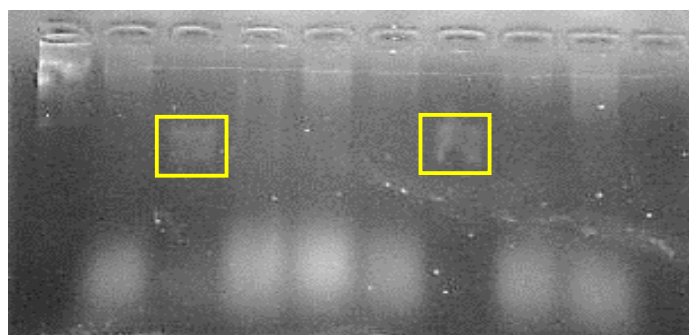


Figura 26: Electroforesis en gel de agarosa al 1% amplificando el *rol-B*, carril 1. PM. 2. ADN-planta, 3. ADN cepa-ATCC-15834, 4 al 6 ADN raíces pilosas, 7-ADN cepa A4, 8-9 ADN raíces pilosas.

9.6 Determinación de la producción de biomasa de las líneas de raíces pilosas:

Después de los 20 días de cultivo se determinó que el incremento de la biomasa en las 6 líneas evaluadas se encuentra entre el 45 y 97 % (Tabla 9).

Cepa	Código de línea	Incremento de biomasa
ATCC-15834	C4-Ex1-R3	45%
	C4-Ex1-R2	97%
	C5-Ex3-R4	57%
	C9-Ex2-R2	63%
A4	C9-Ex2-R1	54%
	C4-Ex2-R3	61%

Tabla 9: Generación de biomasa en 20 días de raíces pilosas de dos cepas (A4 y ATCC15834).

Cabe resaltar que al finalizar este ensayo, se colocó un fragmento pequeño de raíz de cada línea (antes mencionadas en la tabla 9) en matraces con medio basal MS líquido (figura 27-B), con la finalidad de ver el comportamiento de la raíz y se pudo observar un crecimiento más activo (no se realizó índice de crecimiento de este ensayo) y diferencia en el fenotipo de las raíces, no presentaron callos, fueron raíces más largas y blancas no mostraron vellosidades a diferencia de las raíces que crecieron en medio sólido.



Figura 27: A) Raíces pilosas provenientes de medio semisólido, B) y C) Raíces en medio líquido

9.7 Obtención de los extractos y rendimientos

En la siguiente tabla se muestran los pesos y rendimientos de los extractos hexánicos (EH) obtenidos de cada maceración, como se puede observar en las siguientes tablas.

Tabla 10-A: Rendimientos de los EH de plántula <i>in vitro</i>		
Material vegetal	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hoja de plántula <i>in vitro</i>	1.448	4.00
Tallo de plántula <i>in vitro</i>	0.658	0.40
Raíz de plántula <i>in vitro</i>	1.110	0.52

Tabla 10-B: Rendimientos de los EH de planta aclimatada		
Material vegetal	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hoja de planta aclimatada	10.994	5.37
Raíz de planta aclimatada	1.860	1.55

Tabla 10-C: Rendimientos de los EH de raíces transformadas		
Material vegetal	Peso (g)	Rendimiento (%)
Raíz A4 HS-C9-EX2-R1	8.237	1.32
Raíz A4 HS-C4-EX2-R3	4.717	1.29
Raíz ATCC HS-C4-EX1-R3	8.704	1.33
Raíz ATCC HS-C4-EX1-R2	2.665	1.05
Raíz ATCC HS-C9-EX2-R2	2.665	1.20

9.8 Análisis cromatográfico en capa fina de los extractos orgánicos

Se realizó un ensayo de cromatografía de capa fina para comprobar la presencia de las posibles lactonas sesquiterpénicas en los extractos hexánicos de raíces pilosas (dos líneas de A4 y tres líneas de ATCC-15834), de las partes de la plántula *in vitro* (hoja, tallo y raíz), así como hoja y raíz de la planta aclimatada. Como se muestra en las figuras 28A y 28B se puede observar la abundancia de compuestos contenidos en cada extracto.

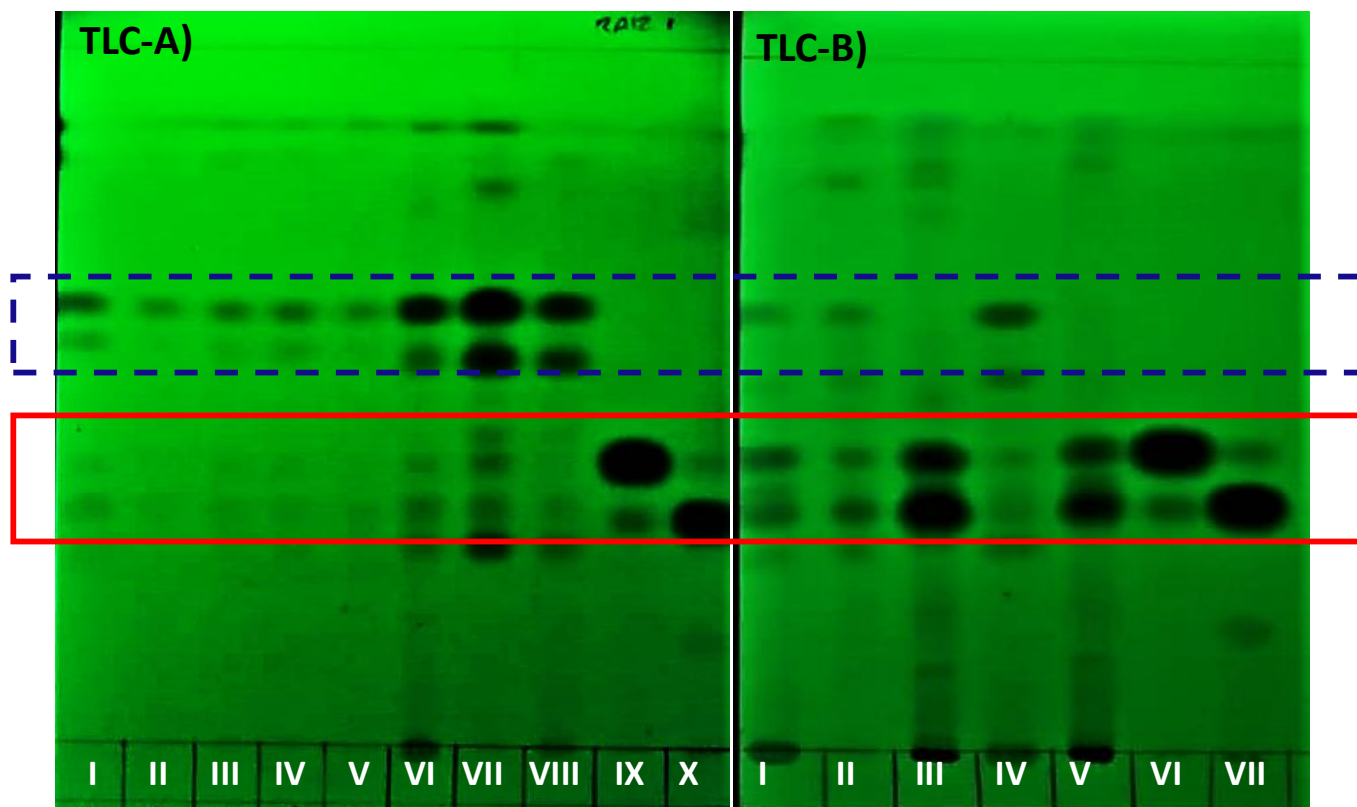


FIGURA 28: TLC-A): carril I y II raíces pilosas provenientes de la transformación con la cepa A4, carril del III al V raíces pilosas provenientes de la transformación con la cepa ATCC-15834, carril VI raíz de plántula *in vitro*, carril VII raíz de planta aclimatada, carril VIII raíz de planta silvestre, carril IX leucodina y carril X achillina. TLC-B): carril I hoja de plántula *in vitro*, carril II hoja de planta aclimatada, carril III hoja de plata silvestre, carril IV tallo de plántula *in vitro*, carril V tallo de plata silvestre, carril VI leucodina y carril VII achillina.

En la figura 28-A se puede observar (rectángulo rojo) que en los carriles I al V que en los extractos obtenidos de las raíces pilosas (carril I y II pertenecen a la cepa A4, carriles III, IV y V pertenecen a la cepa ATCC-15834), se encuentra presente dos compuestos identificados previamente como leucodina (carril IX) y achillina (carril X) en menor proporción que en el extracto de raíz silvestre (carril VIII), sin embargo el carril VI y VII se encuentra en mayor proporción de dichos compuesto que el carril VIII.

Por otra parte, en la figura 28-B se puede observar que los extractos provenientes de hoja carril I (hoja de plántula *in vitro*) y II (hoja de planta aclimatada) poseen los compuestos identificados (carril VI y VII) en el extracto de la hoja de plata silvestre (carril III), de igual manera el tallo de la plántula *in vitro* (carril IV) con respecto al tallo proveniente de la planta silvestre (carril V).

Finalmente es importante destacar que en los extractos derivados del material de cultivo *in vitro* tienen la presencia de los dos compuesto (rectángulo azul, que aún están en proceso de purificación e identificación) antes mencionados por Hernández en el 2018, en menor proporción en las raíces pilosas, pero en similitud en las raíces de plántula *in vitro* y planta aclimatada con respecto a la raíz silvestre y en mayor proporción en las hojas y tallo provenientes de estos cultivos con respecto a las partes de la plata silvestre, sin embargo, se necesitan más ensayos específicos para confirmar la cantidad y presencia de dichas STL en los cultivos *in vitro*.

9.9 Evaluación del efecto relajante a la CE50

Se determinó el efecto relajante en segmentos de aorta aislada de rata (en presencia de endotelio vascular) de los extractos orgánicos provenientes de raíces transformadas de 2 líneas de raíces pilosas (ver Figura 27. TLC-A línea 1 carril I A4 y línea 2 carril III ATCC-15834), a la CE50 de 74 $\mu\text{g}/\text{mL}$, este valor fue tomado en estudios previos por Arias en el 2017, dicha concentración fue obtenida a partir de una curva de concentración respuesta realizada del EH de raíz silvestre de *A. millefolium* en aorta de rata en presencia de endotelio vascular.

En este estudio se demuestra que el efecto relajante de la musculatura lisa de la aorta por los extractos obtenidos de las dos líneas de raíces pilosas fue de un 20 y 26% de actividad con respecto a la raíz silvestre (50%), estos resultados pueden estar corroborando lo reportado por (Arias-Durán, 2017; Glasl *et al.*, 2002a) que el efecto está dado por la presencia de los dos compuestos mayoritarios (rectángulo azul) que se observan en la Figura 29, así como los compuestos ya conocidos (Leucodina y Achillina), sin embargo, a pesar de poseer ambos compuestos la actividad relajante fue mínima, ya que podemos observar en la TLC la poca presencia en los extractos de raíces pilosas, cabe resaltar que para esta prueba no se probaron las demás muestras por que se obtuvo un escaso rendimiento del extracto, por lo tanto tampoco nos permitió realizar el estudio curva concentración respuesta.

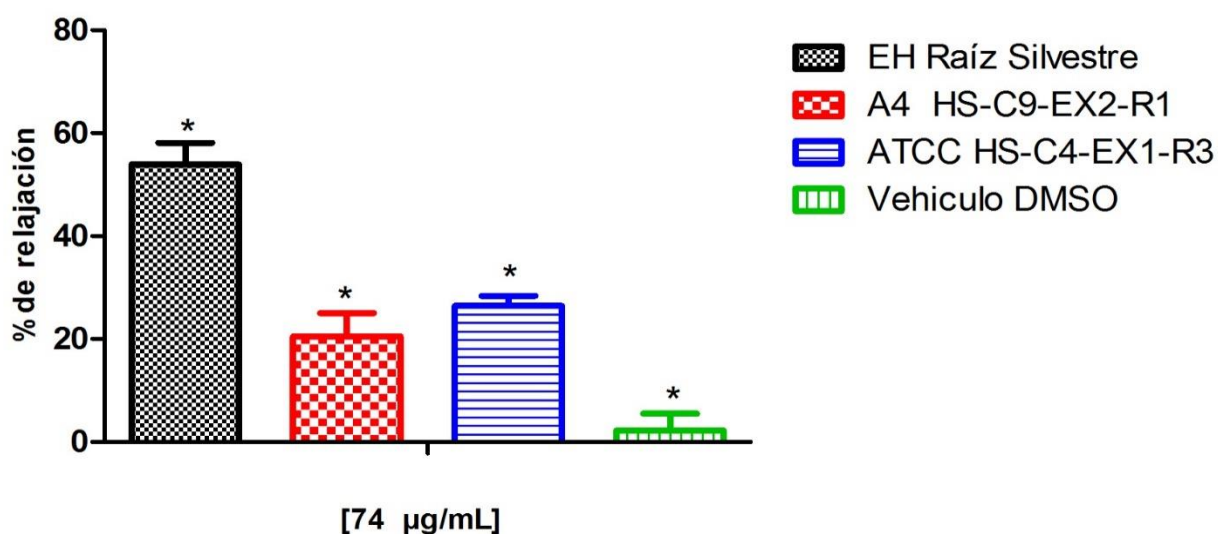


Figura 29: Efecto vasorrelajante de los EH de las 2 líneas (A4 y ATCC15834) de raíces pilosas, en aorta aislada de rata en presencia de endotelio (Tukey's de comparación múltiple) $*p < 0.001$, Raíz silvestre vs Raíz pilosa, Raíz pilosa vs Vehículo.

11. Cromatograma de gases masa

En los cromatogramas siguientes se muestran los compuestos detectados en cada uno de ellos, las STL que fueron identificadas son achillina y matricarina, así mismo se observa sus tiempos de retención y los factores de identificación correspondientes a cada uno, su presencia se confirmó por comparación de los espectros de masas (obtenidos a los tiempos de retención correspondientes) con los espectros de estos compuestos almacenados en la librería, cabe mencionar que leucodina no fue identificado en ninguno de los cromatogramas, en primera estancia porque no se encontraba almacenado en la base de datos, pero se detectó dos puntos de retención de achillina pudiendo ser uno de ellos leucodina ya que son isómeros y el equipo lo detecta como un mismo compuesto, también en los cromatogramas correspondientes a los extractos de raíces pilosas no fue posible detectar ninguna de estas STL.

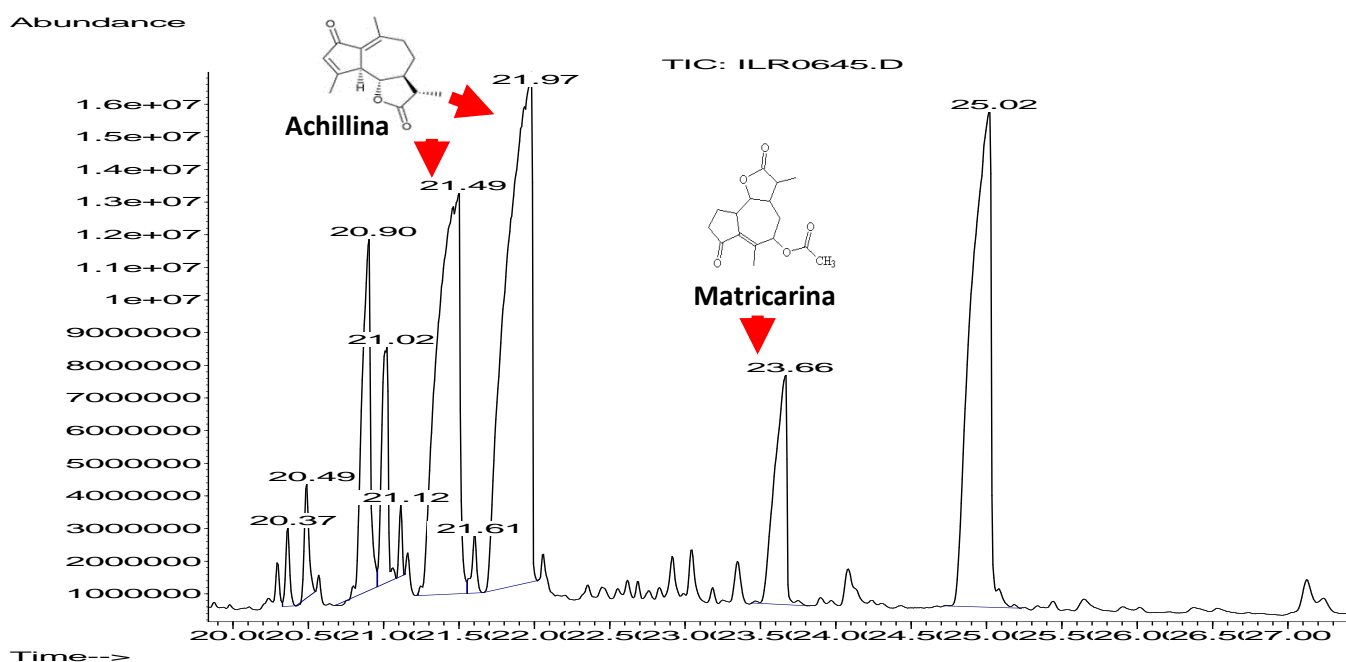
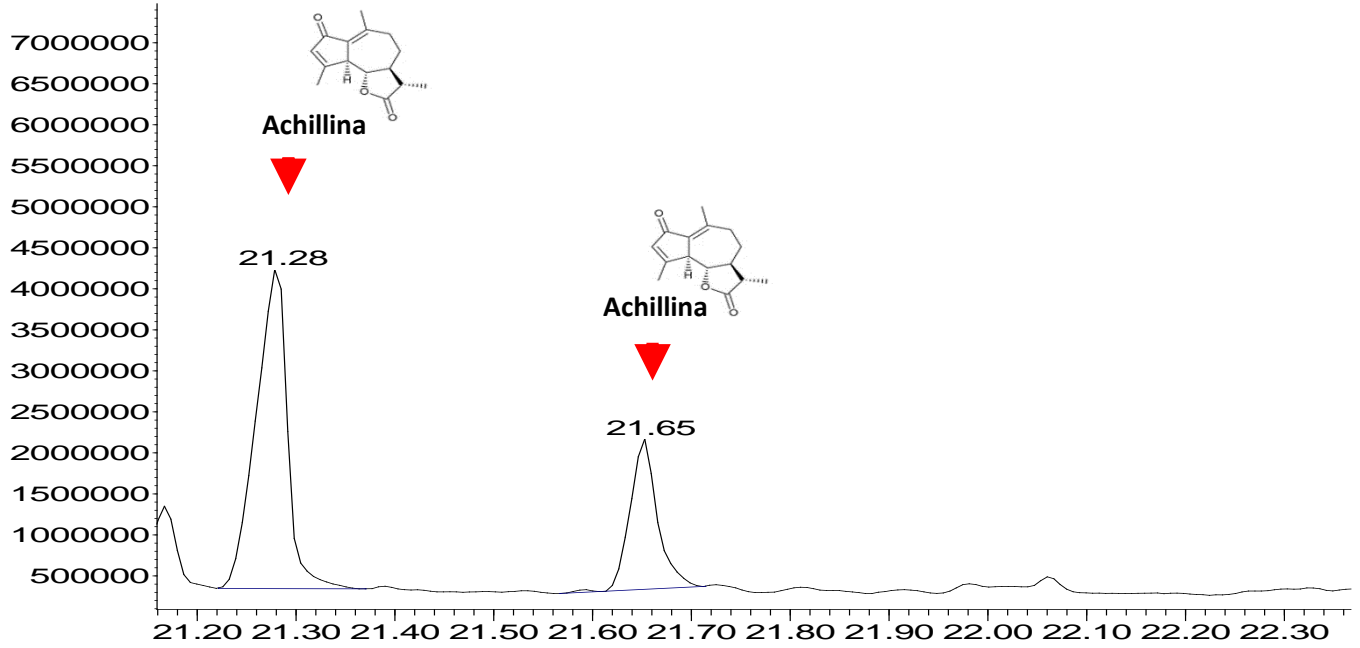


Figura 30: Cromatograma obtenido a partir del EH de la hoja de plántula aclimatada

Abundance

TIC: ILR0648.D

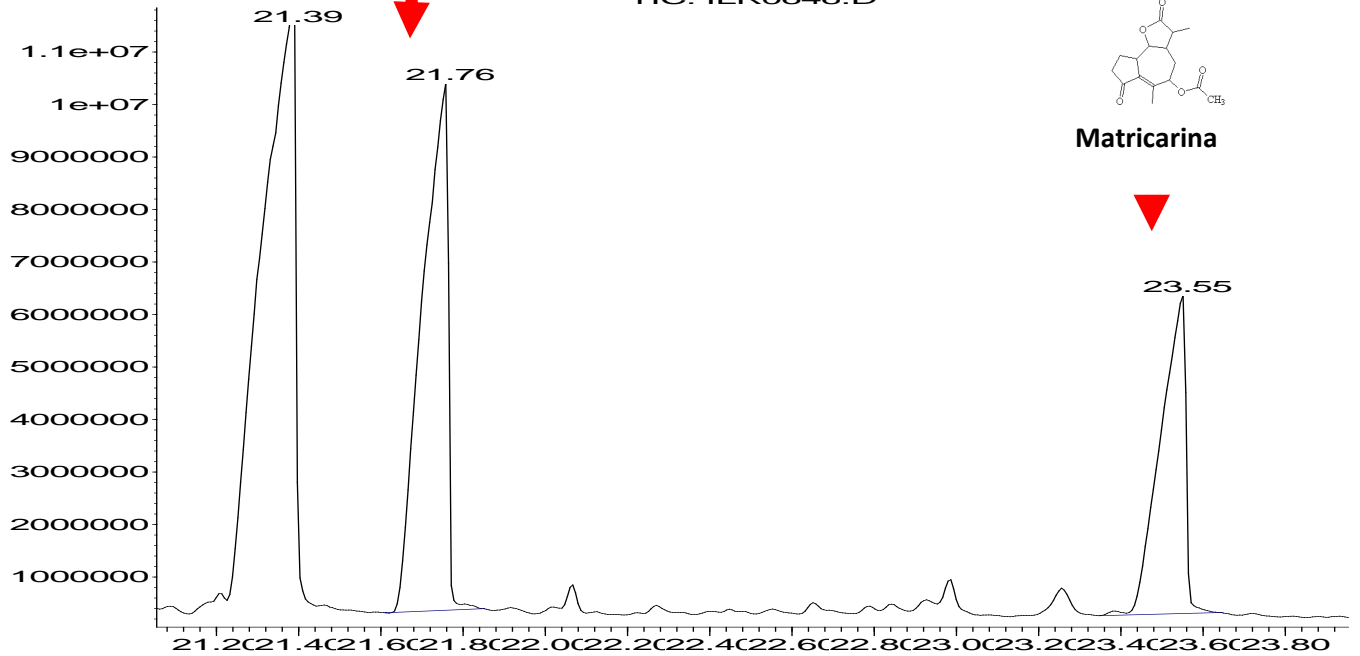


Time-->

Figura 31: Cromatograma obtenido a partir del EH de la raíz de planta aclimatada

Abundance

TIC: ILR0646.D



Time-->

Figura 32: Cromatograma obtenido a partir del EH de la hoja de plántula *in vitro*

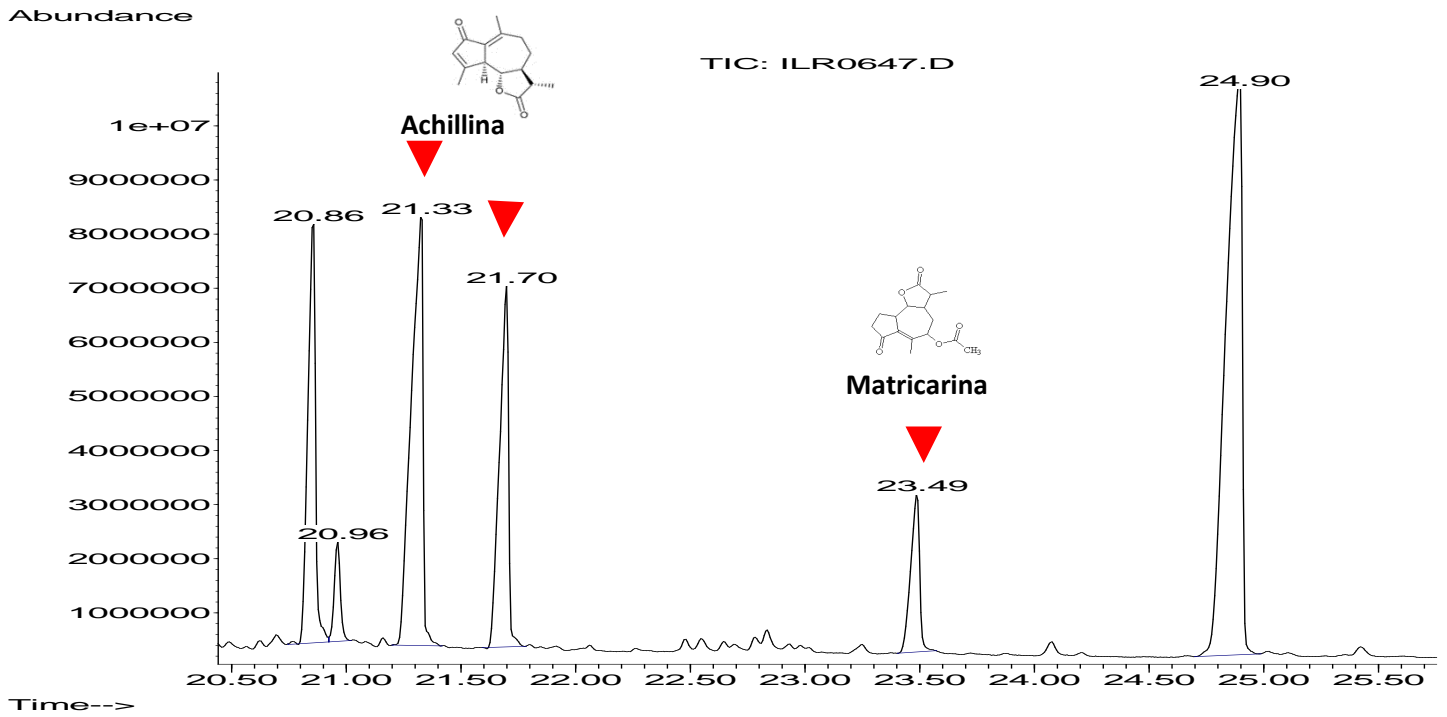


Figura 33: Cromatograma obtenido a partir del EH de la hypocótilo de plántula *in vitro*

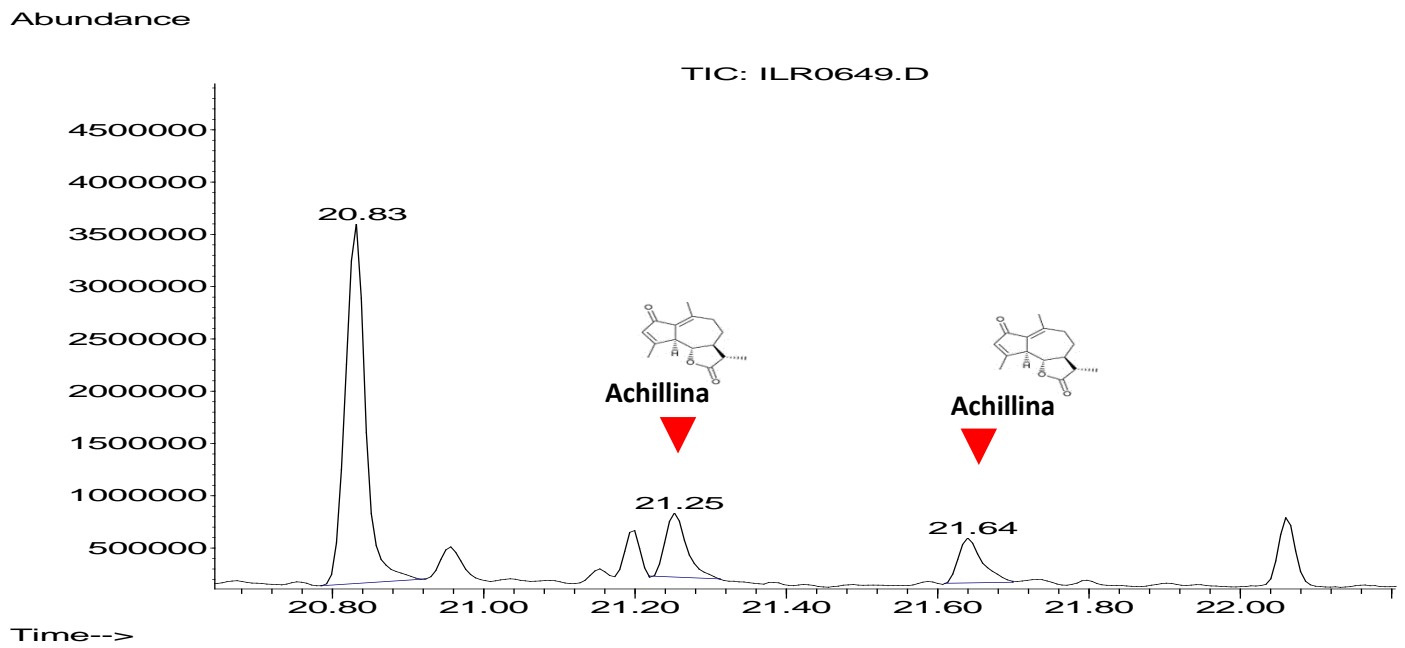
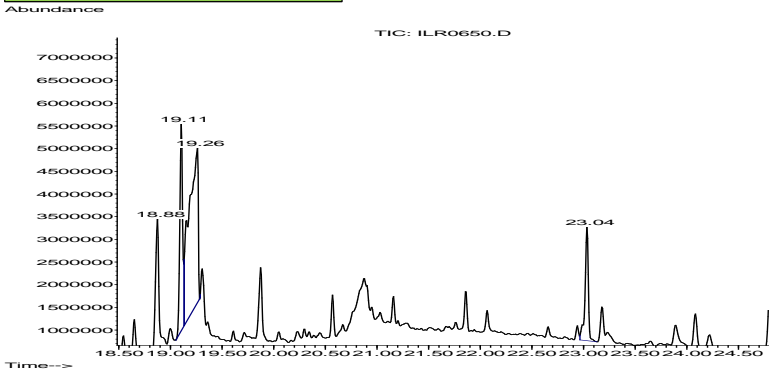


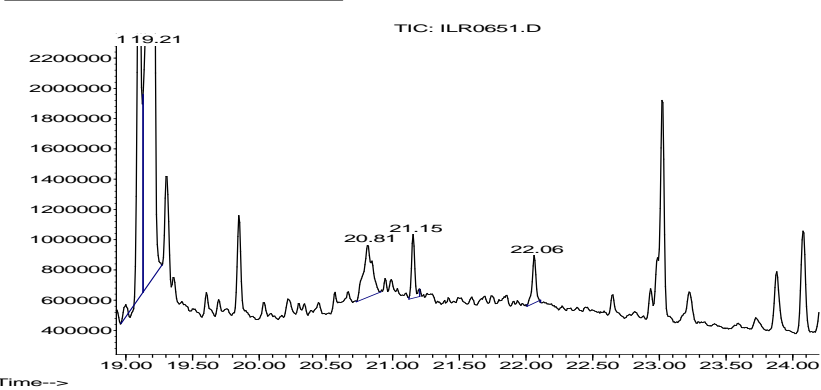
Figura 34: Cromatograma obtenido a partir del EH de la raíz de plántula *in vitro*

Figura 35: Cromatogramas obtenidos a partir del EH provenientes de las cepas A4 y ATCC-15834 de *A. rhizogenes*

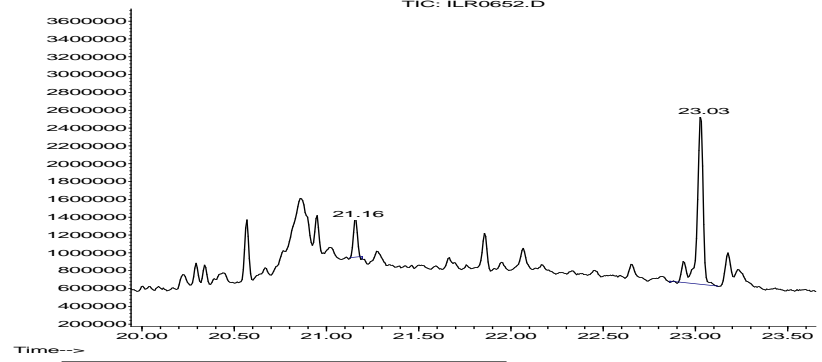
A4-HS-C9-EX2-R1



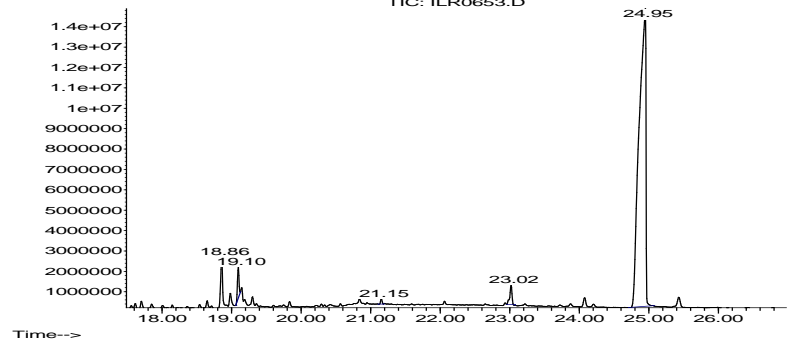
A4-HS-C4-EX2-R3



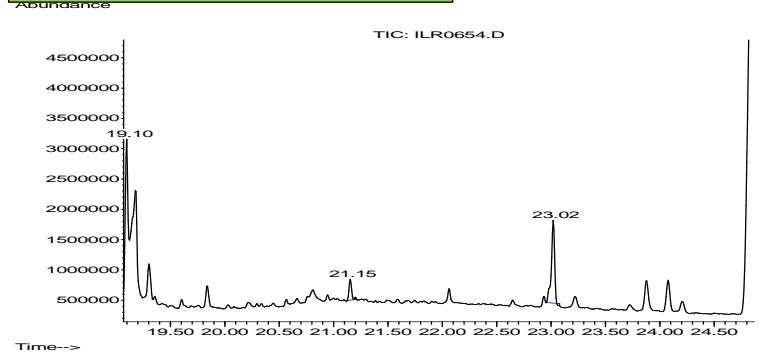
ATCC-15834-HS-C4-EX1-R3



ATCC-15834-HS-C4-EX1-R2



ATCC-15834-HS-C9-EX2-R2



11. DISCUSIÓN

La germinación se inicia con la entrada y absorción de agua en la semilla, así como la estabilización y movilización de nutrientes, y finaliza con el comienzo de la elongación de la radícula, esto en condiciones de laboratorio, y en condiciones de campo se considera como germinación hasta que se produce la emergencia y desarrollo de una plántula normal (Pita y Pérez, 1998). La germinación *in vitro* tiene ventajas respecto a la producida en condiciones naturales, ya que puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, aumentar la tasa de germinación, reducir el tiempo y homogeneizar la germinación (López y González, 1996). También es un método eficiente para obtener un gran número de plantas libres de fuentes contaminantes (Hung *et al.*, 2010).

Por lo tanto, se realizó la germinación *in vitro* de semillas de *A. millefolium* para obtener material vegetal joven y estéril para la posterior implementación de técnicas biotecnológicas necesarias para el estudio de esta planta, nuestros resultados mostraron un porcentaje de germinación entre el 40-50%, esto se debe a que la hidratación de los tejidos de la semilla es un proceso físico con duración variable según la especie, algunos factores que pueden intervenir para que no se lleve a cabo el proceso de germinación en las semillas de algunas Asteraceae son: 1. el tiempo de almacenamiento, se ha observado que entre más tiempo de almacenamiento se reduce la viabilidad de la semilla, 2. la sensibilidad al hidratarse, es decir la falta de integridad de las membranas celulares de las semillas, por disminución de fosfolípidos, carbohidratos y proteínas provoca que la estructura y funcionamiento de las semillas se modifique, y se generen cambios en la permeabilidad, pérdida de fluidez e integridad, y 3. la temperatura es otro factor importante para la conservación de semillas (Hernández *et al.*, 2018: Melo y Cuamatzi, 2008). En el 2015, Robocker reportó que la germinación *in vitro* de *A. millefolium* puede estar afectada significativamente por la variación de la temperatura (15-25 °C), la luz (fotoperiodo) y la estación del año en la que se haya hecho la colecta de la semillas.

El acondicionamiento de plántulas, obtenidas por técnicas de cultivo de tejidos, es una fase transitoria entre el laboratorio y el campo, cuyo objetivo es llevar las plántulas desde un cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro*, durante esta etapa de aclimatización se buscan cambios de las condiciones ambientales del cultivo *in vitro*, generalmente por reducción de los niveles de

azúcares, aumentos en las intensidades de luz, y elevación de los niveles de CO₂, entre otros (Molina et al., 2008) a condiciones normales. Durante esta fase las plantas sufren fuerte estrés fisiológico que en dependencia de la especie puede llegar a morir, en nuestros resultados se logró obtener un porcentaje superior al 86% de superviviencia, lo cual nos indica que *A. millefolium* en un lapso de tiempo de 30 días fue capaz de desarrollar funciones autótrofas.

Por otra parte, en la transformación genética de plantas, el uso de antibióticos de amplio espectro (Rosenstein 2000), han tomado mucha relevancia, principalmente para la eliminación de la bacteria *A. rhizogenes* (Blanco et al., 2003). Por lo tanto, en este ensayo se buscaba determinar la concentración óptima a la cual la bacteria fuera eliminada y dicha concentración no afectara el desarrollo de los explantes, nuestros resultados mostraron que las concentraciones de 200, 300 y 600 mg/L de ceftriaxona y cefotaxima no inhibían el desarrollo del explante ya que se presentó poca visibilidad de oscurecimiento u oxidación, probablemente los explantes se adaptaron al estrés provocado, por lo que el uso de antibióticos a la mayor concentración (600 mg/L) es seguro para eliminar de *A. rhizogenes* después de la infección de los explantes sin causarles daños mayores al explante, sin embargo, se decidió utilizar la concentración de 400 mg/L para eliminar la bacteria y disminuir el efecto de estrés de los explantes utilizados. Generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos cuando se encuentran en situaciones de estrés (Ortega, 2008), por ejemplo los cortes que sufre el explante o el uso de antibióticos que son fuentes exógenas generadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) los cuales son los responsables de la oxidación de las células (Azofeifa, 2009). Por lo que utilizar una concentración de 400 mg/L de ambos antibióticos nos reducía dicho efecto, sin embargo la concentración y uso de los antibióticos depende de cada especie de plantas como lo reportado por Blanco et al., (2003) ellos establecieron que la concentración óptima para la eliminación de la bacteria era de 500 mg/L solo de cefotaxima y que dicha concentración no afectaba al explante.

Con respecto a la formación de raíces, los tres diferentes métodos de infección, así como los diferentes tipos de explantes (hoja, plántula completa de 9 días, plántula completa de tres meses de edad) que se utilizaron en este proyecto, dieron como resultado que el método I y el uso de hojas como explantes para la inducción de raíces transformadas fue mejor para esta

planta con las diferentes cepas utilizadas (A4 y ATCC-15834). Lo que indica que las hojas son un buen tipo de explante para la transformación genética a través del método I, el éxito obtenido puede atribuirse a las propiedades fisiológicas (edad cronológica, su contenido endógeno de hormonas y su estado de diferenciación) de la hoja y al método de infección que facilita a las bacterias en suspensión la mejor adhesión a las células del tejido herido, a diferencia de la infección por el método II o en el cual solo una pequeña parte del explante está en contacto directo con la bacteria (Varghese *et al.*, 2014), ya que los cortes que sufren las plantas estimulan la liberación de compuestos fenólicos, indispensables para la activación de los genes *vir* de *Agrobacterium*, por lo tanto la obtención de raíces a través de este método coincide con lo reportado por García, 2016 que obtuvo satisfactoriamente raíces transformadas por este método para la cepa ATCC-15834 en *Waltheria americana*. Por lo tanto, factores como la susceptibilidad de la especie vegetal y la virulencia de la cepa bacteriana a utilizar, deben ser considerados para la realización de transformaciones mediante *A. rhizogenes* (Torres *et al.*, 2018).

En este ensayo tuvimos un total de 469 raíces, sin embargo cuando se cortaron del explante original, se individualizaron y se sembraron en medio MS sin reguladores de crecimiento, la mayoría de ellas no crecieron, esto se podría explicar como efecto de las células vegetales transformadas cercanas a las raíces que contienen y expresan los genes transferidos a través del T-DNA, producen auxinas y citocininas que modifican el patrón de crecimiento de las células no transformadas que están a su lado (Schmulling *et al.*, 1988).

La confirmación de la transformación por la cepa ATCC-15834 de las raíces individualizadas se realizó por la detección de la emisión de fluorescencia de la proteína TDT, los resultados indican que el 50% presentó la transferencia satisfactoria del gen *tdt* contenido en el plásmido (pTDT), sin embargo el resto de las raíces no mostraron la presencia de la proteína rojo fluorescente, tal vez porque fueron eventos de transformación en los que el tejido sólo recibió los genes incluidos en el T-DNA del plásmido silvestre, lo cual originaría raíces transformadas, pero sin la inserción o expresión del gen *tdt*. Finalmente, la técnica de PCR permite confirmar la inserción de los genes *rol* como evidencia de la transferencia del T-DNA del plásmido Ri (Rodríguez *et al.*, 2007), sin embargo tuvimos problemas en la amplificación de estos genes en el ADN de nuestras raíces, tal vez sea por la calidad del ADN.

En los resultados obtenidos de la prueba vasorrelajante en aorta de rata aislada se obtuvo un 20 al 26% de actividad relajante de los EH provenientes de dos líneas de raíces pilosas en comparación con el porcentaje de actividad del 60% del EH de raíz silvestre, estos resultados podrían estar corroborando lo reportado por Arias, 2017 y Glasl *et al.*, 2002a que dicho efecto podría estar dado por la presencia de dos compuestos mayoritarios (rectángulo azul) que se observan en la TLC (Figura 27), así como los compuestos ya conocidos (Leucodina y Achillina), sin embargo, a pesar de poseer ambos compuestos la actividad relajante fue mínima, ya que podemos observar en la TLC la poca presencia de dichos compuestos en los extracto, cabe mencionar que por la poca cantidad de extracto obtenido en cada una de las líneas de raíces del presente ensayo, solo fue posible analizar 2 de las 5 muestras que se utilizaron, así como los demás extractos provenientes de las partes de la plántula *in vitro* como la *ex vitro*.

12 CONCLUSIÓN

Se logró la germinación de semillas *in vitro* de la semilla de *A. millefolium*, así como la aclimatación de la vitroplantas obtenidas.

Se demostró que *A. millefolium* es una especie susceptible a la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes* y se logró obtener raíces transformadas mediante dos cepas A4 y ATCC-15834 en tres tipos de explantes.

Los extractos hexánicos obtenidos del cultivo de raíces pilosas y vitroplantas presentan compuestos que por sus características en las TLC y GC/MS son lactonas sesquiterpénicas.

Los extractos hexánicos obtenidos del cultivo de raíces pilosas de *Achillea millefolium* indujeron un efecto vasorrelajante.

13. PERSPECTIVAS

Buscar elicitores que incrementen la producción de compuestos con actividad vasorrelajante en el cultivo *in vitro* de *A. millefolium*.

Realizar una curva concentración respuesta para determinar el efecto vasorrelajante de los extractos hexánicos de los diferentes cultivos (raíces pilosas, plantas aclimatadas y plántulas *in vitro*).

Realizar pruebas más específicas como lo es la cromatografía líquida de alta (HPLC) para la identificación de las SLT en las raíces pilosas.

14. REFERENCIAS

- Akram M. (2013). Mini review on *Achillea Millefolium* Linn. J Membrane Biol 246: 661-663.
- Alarcón, F., Román, R., Flores, J. (1993). Plantas medicinales usadas en el control de la diabetes mellitus. Ciencia, 44: 363-381.
- Alarcón A., F.J., Roman-Ramos, R., Flores Saenz, J.L, Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., Gonzalez-Paredes, B. (1997). Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. Journal of Ethnopharmacology, 55: 171-177.
- Rodríguez G., Morales F., Gutiérrez R., Aguilar S., Pérez E., (2007). Generation of transformed roots of agave salmiana otto and their colonization by glomus intraradices. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 30 (3): 215 – 222.
- Alonso C., Maldonado M., Zarate M., Jacobo S., Fernández G., Figueroa Z., Rios R., De León R., Medellín C., Reyes M., Méndez M., Carranza A., (2012). Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. Doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.035.
- Anne O, Elmar A, Ain R. (2006). Phytochemical analysis of the essential oil of *Achillea millefolium* L. from various European countries. Nat Prod Res 20: 1082–1088.
- Applequist WL, Moerman DE. (2011). Yarrow (*Achillea Millefolium* L.): a neglected panacea? A review of ethnobotany, bioactivity and biomedical research. Econo Bot 65: 209–225.
- Arteche A., J.A. Fernández, J.I. Güenechea. B. Vanaclotxa (1998): Fitoterapia. Vademecum de prescripción. 3ª ed. Citape. S.L.
- Bayes A., Lopez J., Alegria E., (2003). Cardiología clínica, editorial Elsevier España.

Castellanos J., Catalina C., Carmona A. (2007). Anatomía humana general, editorial universidad de Sevilla. España, 2 edición.

Chaturvedi HC, Jain M & Kidwai NR., (2007). Indian J Exp Biol, 45- 937.

Dodds, J., Lorin W. (1982). Experiments in Plant Tissue Culture. Chapter 4. Initiation and maintenace of callus.

Eghdami A., Sadeghi F. (2010). Determination of total phenolic and flavonoids contents in methanolic and aqueous extract of *Achillea millefolium*. Org Chem J 2: 81 –84.

Fernandez M., (2016). Hipertensión arterial sistémica (información para pacientes). Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (México).

Figueiredo C. (1991). *Achillea millefolium* (Yarrow) cell suspension cultures: establishment and growth conditions. Biotechnology Letters Vol 13 No 1 63-68

Fonnegra G., Jimenez S. (2007). Plantas Medicinales aprobadas en Colombia. 2da Edición, Pag. 188-189.

Glasl S., Mucajia P., Wenera I., Presserc A., and Jurenitscha J. (2002). Sesquiterpenes and Flavonoid Aglycones from a Hungarian Taxon of the *Achillea millefolium* Group. Z. Naturforsch. 57c, 976Ð982.

Gamborg O., Miller R., Ojima K. (1968). Exp. Cell Res. 50: 151-158.

Imtiyaz Ali, B. Gopalakrishnan and V. Venkatesalu. (2017). Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achillea Millefolium* L.: A Review. Phytother. Res. 31: 1140–1161.

Lallana, V. y Lallana Ma. (2003). Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias – UNER.

Mojtaba M., Masoud M., Dalir N. and Ghader J. (2017). Does *Achillea millefolium* extracts possess prokinetic effects on the bovine abomasum through M3 muscarinic receptors? Spring; 8(2): 115–120.

Molina H., Tellez A., Diaz, Perez G., Olivera L., Teresa J. (2004). Anticonflict actions of aqueous extracts of flowers of *Achillea millefolium* L. vary according to the estrous cycle phases in Wistar rats. DOI: 10.1002/ptr.1578

Mozaffarian V. (2009). A Dictionary of Iranian Plant Names. Tehran: Farhang Moaser Pub; 596.

Muñoz C., Santos B., and Alonso B. (1999). Plantas medicinales españolas. *Achillea millefolium* L. (asteraceae). (milenrama) spanish medicinal plants. *Achillea millefolium*l. (milfoi). ISSN: 0214-3402.

Murashige T: Skoog F., (1962) *Physiol Plant.* 15, 473.

OMS. (2004). <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>.

Pita J, Perez F. (1998). Germinación de semillas, Dpto. De Biología Vegetal, E.U. Ingeniería Técnica Agrícola, UPM 28040 Madrid.

Rzedowski, G. Rzedowski J., (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Segretín Ma. Eugenia. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). INGEBI-CONICET - Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA.

Shatnawi M., (2013). Multiplication and Cryopreservation of Yarrow (*Achillea millefolium* L., Asteraceae). J. Agr. Sci. Tech. Vol. 15: 163-173.

Stevens G., Dias R., Thomas K., Rivera J., Carvalho N., *et al.* (2008). Characterizing the epidemiological transition in Mexico: National and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. PLoS Med 5(6): e125.

Sunthareswaran F., (2004). Lo esencial en el sistema cardiovascular, editorial Elsevier science, Madrid España, 2 edición.

Turker. Buhara Y., E. Gurel. (2009). In Vitro Regeneration of *Achillea millefolium* L from Shoot-tips and Root Segments of Seedlings. Issue 1, pp 65–69.

Varghese, S., Keshavachandran, R., Baby, B., Nazeem, P., (2014). Genetic transformation in ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal) for hairy root induction and enhancement of secondary metabolites. Journal of Tropical Agriculture 52 (1) ,39-46.

Villaseñor Ríos, J. L. y F. J. Espinosa García. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Wichtl M. (2004). Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis, Third [English] edn. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart: Germany.

Willuhn G. (2002). Millefolii herba. In Teedrogen und Phytopharmaka, Wichtl M (ed), fourth edn. Wiss. Verlagsgesellschaft: Stuttgart; 399–403.

Warren E, Weatherley-Jones E, Chilcott J, Beverley C. Systematic review and economic evaluation of a long-acting insulin analogue, insulin glargine. *Health Technol Assess* 2004; 8(45): 1-57.

Welsch U. (2008), *Histología*, editorial medica panamericana, San Juan Argentina, 2 edición, departamento ciencias médicas.



Cuernavaca, Morelos a 30 de Octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)
Dr. Ismael León Rivera
Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Dr. José de Jesús Arellano García

Tesis: "Determinación de la presencia de compuestos con capacidad vasorrelajante en cultivos *in vitro* y *ex vitro* de *Achillea millefolium* L.

Alumno que la presenta a revisión: LETICIA AIDE MORALES LUNA

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. IRENÉ DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)
Dr. Ismael León Rivera
Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Dr. José de Jesús Arellano García

Tesis: "Determinación de la presencia de compuestos con capacidad vasorrelajante en cultivos *in vitro* y *ex vitro* de *Achillea millefolium* L.

Alumno que la presenta a revisión: LETICIA AIDE MORALES LUNA

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO



Cuernavaca, Morelos a 30 de Octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)
Dr. Ismael León Rivera
Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Dr. José de Jesús Arellano García

Tesis: "Determinación de la presencia de compuestos con capacidad vasorrelajante en cultivos *in vitro* y *ex vitro* de *Achillea millefolium* L.

Alumno que la presenta a revisión: LETICIA AIDE MORALES LUNA

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. ISMAEL LEON RIVERA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)
Dr. Ismael León Rivera
Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Dr. José de Jesús Arellano García

Tesis: "Determinación de la presencia de compuestos con capacidad vasorrelajante en cultivos *in vitro* y *ex vitro* de *Achillea millefolium* L.

Alumno que la presenta a revisión: LETICIA AIDE MORALES LUNA

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ



Cuernavaca, Morelos a 30 de Octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (Tutor)
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (Co Tutor)
Dr. Ismael León Rivera
Dra. María del Refugio Trejo Hernández
Dr. José de Jesús Arellano García

Tesis: "Determinación de la presencia de compuestos con capacidad
vasorrelajante en cultivos *in vitro* y *ex vitro* de *Achillea millefolium* L.

Alumno que la presenta a revisión: LETICIA AIDE MORALES LUNA

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA