

00361

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
 FACULTAD DE CIENCIAS  
 DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
 COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
 LABORATORIO DE FITOFÁRMACOS

18

“Estudio morfológico, histoquímico y de cuantificación de los  
 principios activos en células cultivadas de  
*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret  
 para su utilización en un sistema  
 experimental de liberación  
 de fármacos.”

295772

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
 MAESTRÍA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

Erika Rivera Arce



COORDINACION  
 POSGRADO EN CIENCIAS  
 BIOLÓGICAS

2001

México, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Resumen

En el presente trabajo se reportan los estudios básicos de anatomía e histoquímica de cultivos celulares de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret., realizados con el propósito de seleccionar las células idóneas para ser utilizadas en un sistema experimental de liberación de fármacos.

Los cultivos celulares (callos) se obtuvieron a partir de plántulas, utilizando el ápice, la raíz, el tallo y las hojas. Se tomaron muestras de los callos de cada uno de los cultivos a partir de la tercera semana de crecimiento y hasta la semana 21 en que terminó la observación, para ser procesadas bajo las técnicas de histología utilizando la tinción de safranina-verde rápido y analizadas por microscopía de luz. Al mismo tiempo, se realizaron cortes en fresco de las mismas muestras para la detección de saponinas, taninos, alcaloides, lignina y almidón mediante ensayos histoquímicos. Los resultados indicaron que el cultivo celular procedente del ápice es el más adecuado para los propósitos del modelo ya que presentó el menor grado de diferenciación celular, una consistencia adecuada y muy poca formación de elementos traqueales, a diferencia de los callos provenientes de los otros explantes en los que el proceso de diferenciación se inició dentro de las primeras tres semanas de cultivo. Los estudios cromatográficos por HPLC indicaron que las muestras de los callos originados a partir de los explantes de tallo y de raíz presentaron una mayor concentración de N,N,-dimetilriptamina.

## CONTENIDO

### Resumen

I.	<b>Introducción</b> .....	1
	a. Antecedentes generales sobre <i>Mimosa tenuiflora</i> .....	1
	b. Aspectos fitoquímicos.....	3
	c. Aspectos farmacológicos.....	7
	d. Aspectos biotecnológicos.....	10
	e. Los Sistemas de Liberación de Fármacos.....	12
	f. Los Trasplantes Planta-Animal.....	20
	g. Planteamiento del trabajo.....	28
II.	<b>Objetivos</b> .....	29
	a. Objetivo general.....	29
	b. Objetivos específicos.....	29
III.	<b>Material y Métodos</b> .....	30
	a. Colecta de semillas.....	30
	b. Germinación.....	30
	c. Obtención de plántulas.....	30
	d. Inducción de los callos.....	31
	e. Procedimientos para el análisis anatómico-histoquímico.....	31
	f. Método de HPL para N,N <sub>2</sub> -dimetilriptamina .....	33
IV.	<b>Resultados y Discusión</b> .....	34
	a. Características macroscópicas generales de los cultivos celulares (callos).....	34
	b. Anatomía de los callos.....	40
	i. Apice .....	41
	ii. Tallo .....	50
	iii. Raíz.....	58
	iv. Hoja.....	64
	c. Histoquímica de los cultivos celulares.....	73
	v. Saponinas y taninos.....	74
	vi. Alcaloides.....	81
	vii. Lignina.....	87
	viii. Almidón.....	87
	d. Detección de N,N <sub>2</sub> -dimetilriptamina.....	88

---

V.	<b>Conclusiones</b> .....	90
VI.	<b>Bibliografía</b> .....	92
VII.	<b>Anexos</b> .....	97

## I. Introducción

### a. Antecedentes generales sobre *Mimosa tenuiflora*.

La corteza de la *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret (Leguminosae), llamada popularmente "tepescohuite" se utiliza para curar y facilitar la cicatrización de las quemaduras y heridas de la piel. El uso medicinal de esta especie vegetal ha despertado el interés comercial y social a partir de que fue utilizada para tratar al gran número de personas con quemaduras que produjo la explosión de la estación de gas ubicada en San Juan Ixhuatepec en el Estado de México en 1984. La corteza de ésta planta también se utilizó en los heridos del terremoto en la Ciudad de México ocurrido en Septiembre de 1985 (Camargo-Ricalde, 1996). En esas ocasiones, las personas lesionadas recibieron tratamiento a base de la corteza pulverizada del tepescohuite aplicada directamente sobre la piel y los medios de comunicación masiva dieron a conocer el efecto notablemente benéfico que produjo este recurso en la cicatrización de las quemaduras de primero y segundo grado. Estas observaciones médicas estimularon el interés por conocer, mediante una serie de estudios científicos, las propiedades medicinales de esta especie vegetal. El primer estudio que se realizó fue de tipo etnobotánico en el cual se determinó que esta especie medicinal se encuentra ampliamente distribuida desde México y Centroamérica (Honduras, El Salvador, Panamá) hasta parte de Sudamérica (Colombia, Venezuela y Brasil). En México, la *M. tenuiflora* se distribuye a partir del Altiplano Central, predominando en el sur de país (Camargo-Ricalde y col., 1994). Es en Chiapas donde se utiliza frecuentemente como remedio vegetal para curar las heridas y las quemaduras de la piel. Tradicionalmente, la planta se utiliza en

dos formas: la primera, para elaborar una decocción concentrada con los fragmentos de la corteza deshidratada que se aplica en forma de compresa húmeda en el área lesionada de la piel o bien, como enjuague bucal en el caso de algunas lesiones de las encías y mucosas. La segunda forma es, utilizando la misma corteza deshidratada, para producir un pulverizado que se aplica directamente sobre la piel o bien, se mezcla con grasa animal a manera de pomada (Camargo-Ricalde y col., 1994). Actualmente, en México, *M. tenuiflora* tiene cierta importancia económica debido a la explotación comercial que se hace de la corteza para elaborar productos medicinales y cosméticos propuestos para diferentes alteraciones cutáneas. Debido a los antecedentes antes mencionados y a la difusión que se hizo de *M. tenuiflora* como "árbol maravilloso" y "remedio panacea", grupos de científicos en varias partes del mundo realizaron estudios sobre esta especie, tanto en el área de la botánica y la farmacología, como de química y biotecnología. En México, el Instituto Mexicano del Seguro Social, seguido de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (División de Ciencias Biológicas y de la Salud: Departamento de Biología), el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (Departamento de Química) y la Universidad Nacional Autónoma de México (Facultad de Química); en Francia, el Laboratoire de Pharmacognosie de la Université Louis Pasteur y el Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Reims Cedes y el Laboratoire UPSA Rueil-Malmaison Cedes; en Suiza, el Laboratoire de Toxicologie Analytique, UIML, de la Université de Lausanne.

El estudio taxonómico de *M. tenuiflora*, se realizó en México y establece que el tepescohuite pertenece al género *Mimosa*, de la familia *Leguminosae*, Subfamilia *Mimosoideae*, Tribu *Mimosaceae*. El género *Mimosa* comprende aproximadamente unas 500 especies distribuidas en

diferentes partes del mundo: el 90% de ellas está repartido en América y el resto en Asia, África y Australia; en México existen 100 especies de *Mimosa* (Grether, 1978; Camargo-Ricalde y col., 1995) y el género posee gran importancia económica debido a su diversidad de aplicaciones: uso medicinal y cosmético, alimento para el ganado, como madera para la construcción y como fuente de combustible (Camargo-Ricalde y col., 1995). Ocho de estas especies son consideradas medicinalmente útiles: *M. purpurascens* R. L. Robindon, *M. albida* Humb & Bonpl., *M. pudica* L., *M. invisa* Mart., *M. sensitiva*, *M. pigra* L., *M. hemiedyta* Rose & Robinson y *M. tenuiflora* (Hernández y Rivera, 1989)

#### b. Aspectos fitoquímicos

De acuerdo con la literatura fitoquímica el género *Mimosa* contiene los siguientes compuestos: catecol-taninos (*M. regnelli*);  $\beta$ -amirina, friedelina y  $\beta$ -sitosterol (*M. rubicalis*); ácido 3-0-arabinosil morólico (*M. caesalpiniaefolia*); sustancia G, glucósido fenólico, sustancia E, ácido carboxílico alifático, 4-0-(6-0-sulfo- $\beta$ -D-glucopiranosil)-ácido gálico, 4-0-( $\beta$ -D-glucopiranosiduronil)-ácido gálico, 2'3'-guanosina ciclomonofosfato, 2'3'-adenosina ciclomonofosfato, 3'-adenosina monofosfato y 3'-guanosina monofosfato (*M. pudica*); algunos de estos compuestos también se han encontrado en el género *Acacia*, que se considera quimiotaxonómicamente cercano, en especies como *Acacia karro* (Hernández y Rivera, 1989).

Se ha reportado la presencia en el género de triptamina y N-metilriptamina (*M. somnians*) (Gupta y cols., 1979); N,N,-dimetilriptamina (*M. tenuiflora* y *M. hostilis*). Hernández y Rivera (1989) mencionaron que los

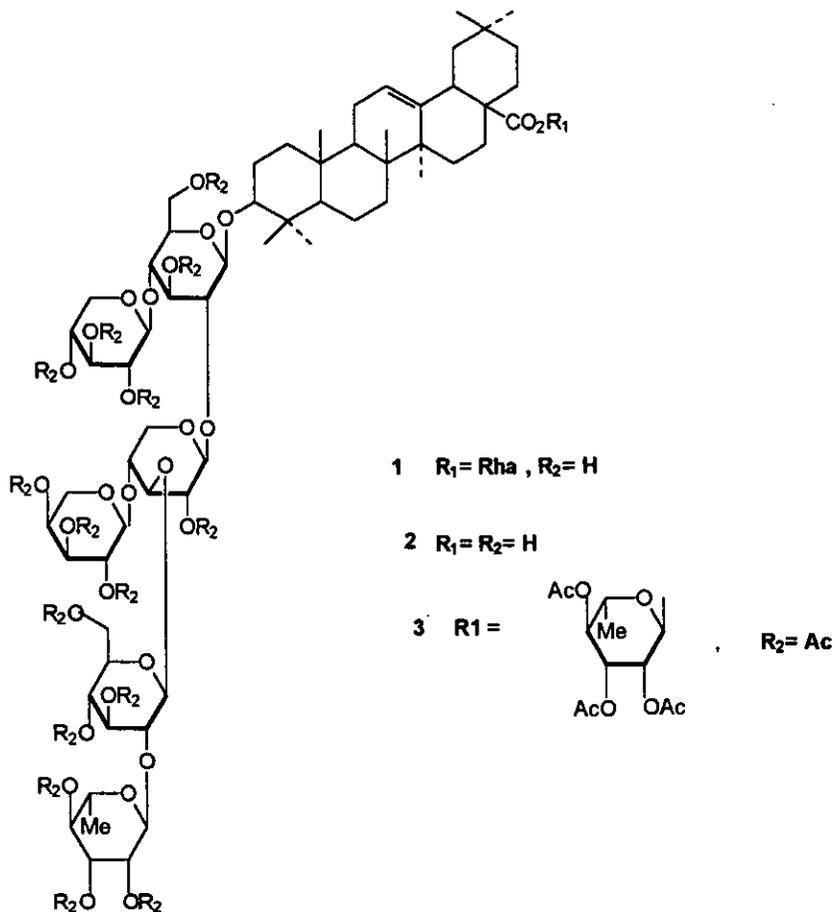
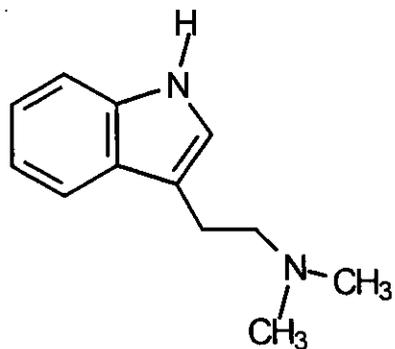
principales metabolitos secundarios son un esteroide y tres triterpenoides, que derivan de la  $\beta$ -amirina en forma de sapogeninas.

La N,N,-dimetiltriptamina (DMT) es un derivado indólico cuya acción sobre el Sistema Nervioso Central es conocida. Cuando la DMT es administrada en forma pura y por la vía endovenosa produce efectos alucinógenos y un aumento generalizado de la percepción sensorial; los síntomas psíquicos aparecen a los 3 a 5 minutos después de su administración y se prolongan durante una hora, siendo rápidamente metabolizada y totalmente excretada en la orina en la forma del ácido 3-indolacético (IAA); que a diferencia de la mezcalina, su efecto psicótico se produce de manera más rápida después de su administración (Szára, 1956).

La N,N,-dimetiltriptamina (DMT) pertenece a la fracción de las indolaminas derivadas del aminoácido triptofano, la cual se encuentra ampliamente distribuida en las Gramíneas y Leguminosas. En las plantas, la triptamina es el precursor de un fitoregulator de crecimiento, el ácido indol acético. Las triptaminas también son precursoras de los alcaloides tricíclicos derivados de la  $\beta$ -carbolina. Las indolaminas como la N,N,dimetiltriptamina, la bufotenina y la metoxy N-dimetiltriptamina son todos constituyentes alucinógenos presentes en diferentes preparaciones a base de plantas (decocciones) las cuales son utilizadas por diversos grupos étnicos de Sudamérica. Algunas de los géneros que las contienen son: *Piptadenia*, *Banisteriopsis*, *Virola*, y *Lespedeza*. La N,N, dimetiltriptamina es inactiva por la vía oral, probablemente porque sufre deaminación por acción de la monoamino oxidasa a nivel hepático o intestinal, por lo que ésta es únicamente efectiva cuando se administra parenteralmente o por inhalación. Sin embargo, cuando la N,N,dimetiltriptamina es administrada junto con la  $\beta$ -carbolina puede llegar a tener actividad por la vía oral, ya que ésta última inhibe a la mono-amino-

oxidasa. (Smith, 1977; Mckenna y col., 1984). Shultes y Hoffman (1980), refieren que los aborígenes del noreste de Brasil hacían uso de la raíz de *Mimosa hostilis* para preparar una bebida (llamada jurema) la cual era utilizada en ceremonias o rituales de origen afro-americano entre los indígenas de diferentes tribus como son: los Pankarurú, Karirí, Tusha, Fulnio, Guague Acroa, Pimentiera y Atanaya. Este mismo autor mencionó que Later (1881), reportó que en la medicina tradicional de los sertões se utiliza la corteza de este árbol para curar la fatiga y el malestar. Finalmente, menciona que en 1946 se aisló de las raíces de *M. hostilis* un alcaloide inicialmente llamado nigerina, pero que estudios posteriores la identificaron como N,N,-dimetilriptamina la cuál se extrajo con un rendimiento de 0.57 %. También se sabe que este alcaloide es uno de los principales constituyentes del género *Anadenanthera* con propiedades alucinógenas.

Dentro del género de *Mimosa*, en México, la especie medicinal *M. tenuiflora* ha sido muy explotada debido al doble uso que se le da, medicinalmente, como se ha dicho, es utilizada tópicamente para las quemaduras y algunas lesiones de la piel aplicado en humanos y en el ganado y porque su madera se utiliza como combustible y los troncos para la elaboración de cercas. Camargo-Ricalde (1996), describió las características organolépticas de la corteza de éste árbol: “...de textura rugosa, color café-rojizo a grisáceo, grosor 5-15mm, sabor resinoso y astringente, olor resinoso y dulce”.

**A****B****N,N-dimethyltryptamine**

**Figura 1.** Principales compuestos que han sido identificados en la corteza de *Mimosa tenuiflora*.

**A.-** saponinas triterpénicas: 1. Mimonósido A; 2. Mimonósido B y 3. Mimonósido C.

**B.-** alcaloide N,N-dimetiltriptamina.

### c. Aspectos farmacológicos

Fueron los investigadores de plantas medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) quienes se dieron a la tarea de desarrollar una serie de estudios farmacológicos y químicos buscando explicar las propiedades curativas de la corteza pulverizada del tepescohuite. Se publicó un estudio sobre las propiedades antimicrobianas de los extractos etanólicos y acuosos elaborados con la corteza pulverizada de *M. tenuiflora*. Estos estudios se realizaron en cultivos de microorganismos que se encuentran normalmente en el tejido cutáneo y microorganismos potencialmente patógenos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. Para la prueba de dermatofitos se empleó: *Trychophyton mentagrophytes*, *Trycophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Microsporum gypseum*. Los resultados indicaron que los extractos inhibieron el crecimiento de microorganismos gram-positivos y gram-negativos, de levaduras y de los dermatofitos (Lozoya y col., 1989). Posteriormente, en el mismo IMSS, se realizó un estudio *in vitro* en el que se utilizaron distintos modelos biológicos con diferentes extractos de corteza de tepescohuite: acetato de etilo (con elevada concentración de taninos), extracto butanólico (rico en alcaloides y saponinas triterpénicas) y extracto metanólico (rico en saponinas). Todos los extractos provocaron cambios en la excitabilidad del músculo liso, pero el extracto butanólico indujo una respuesta mas intensa ya que a muy pequeñas dosis provocó la paralización del peristaltismo intestinal, con aumento de la amplitud y la frecuencia de contracción de tiras aisladas de útero y alteraciones en el tono muscular del fundus gástrico. Estos mismos extractos provocaron hemodiálisis, observándose un efecto mayor con los extractos

butanólico y metanólico. En los estudios sobre el crecimiento de microorganismos *in vitro*, los extractos alteraron la evolución de los cultivos; el extracto de acetato de etilo poseía la mayor actividad. Cada uno de los extractos se caracterizó por tener una respuesta específica en los diferentes modelos *in vitro*, estos efectos estuvieron relacionados con los componentes mayoritarios de cada extracto (Meckes-Lozoya y col., 1990a). En otros reportes se identificó la fracción química responsable del efecto de los extractos sobre la musculatura lisa; se aisló una fracción con indolalquilaminas, derivadas del triptofano, demostrándose que esta fracción fué también la responsable de la inhibición del reflejo peristáltico en el íleon terminal del cobayo (Meckes-Lozoya y col., 1990b). Finalmente, se aisló el compuesto principal de esta fracción, obteniéndose un rendimiento del 0.03% de N, N,dimetiltriptamina y trazas de serotonina en un 0.001%. No se detectaron otros derivados de la triptamina (bufotenina, 5-metoxitriptamina, N,metiltriptamina y 5-metoxy-Nb'Nb-dimetiltriptamina) (Meckes-Lozoya y col., 1990c).

De acuerdo con las observaciones clínicas el producto pulverizado de corteza aplicado directamente en úlceras venosas produjo cierta acción analgésica local, si bien no se ha dilucidado la estructura del compuesto responsable. Otros estudios indicaron que la corteza contiene compuestos del grupo químico de los elagitaninos a los que se atribuyen las propiedades antimicrobianas de la corteza (Lozoya y col., 1989) y que pudieran influir en el efecto cicatrizante.

Se han reportado, también, los efectos de tres extractos (éter de petróleo, acetato de etilo y butanol) de corteza de *M. tenuiflora* sobre el crecimiento de dos líneas celulares humanas *in vitro*, evaluándose la modificación en el crecimiento de fibroblastos embriogénicos normales

(W138) y de células KB de carcinoma nasofaríngeo. El extracto butanólico y el de acetato de etilo disminuyeron el crecimiento de estos cultivos, mientras que el extracto de éter de petróleo incrementó significativamente la proliferación de estas células. Los resultados obtenidos en esa investigación se relacionaron con estudios previos de citotoxicidad hechos con la misma especie en los cuales el extracto butanólico y de acetato de etilo fueron activos contra KB y P388, con valores ED50 de por debajo de 20µg/ml; el extracto de éter de petróleo, por su parte, no mostró toxicidad alguna contra estas células. En este mismo estudio no se describió la naturaleza de los compuestos bioactivos, sin embargo, se propuso que los taninos podrían ser los responsables de los efectos observados (Villareal y col., 1991). Estudios posteriores, realizados por otros grupos en el extranjero, permitieron identificar al grupo inductor de la proliferación celular observada con extractos de corteza de tepescohuite. Un grupo francés reportó el aislamiento y la elucidación estructural de un grupo de saponinas presentes en la corteza del árbol: tres saponinas triterpenoides denominadas mimonósidos A, B y C (Jiang y col., 1991a, 1991b, Antón y col., 1993) y tres saponinas esteroidales: 3-*O*-β-D-glucopiranosil campesterol, 3-*O*-β-D-glucopiranosil estigmasterol, 3-*O*-β-D-glucopiranosil β-sitosterol, junto con concentraciones traza de glucosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, lupeol, y una gran cantidad de taninos condensados. Los mimonósidos y las saponinas esteroidales han sido identificados como característicos del género *Mimosa*. Estos mismos compuestos se sometieron a pruebas biológicas de toxicidad, inmunomodulación y proliferación celular *in vitro* utilizando diferentes líneas celulares animales y humanas (Anton y col., 1993). Las saponinas triterpenoides no fueron citotóxicas sobre células de linfoma, ni produjeron inhibición de la proliferación celular de las mismas. A continuación, se evaluó

el efecto de las tres saponinas (mimonósidos A, B y C) sobre el crecimiento de timocitos y esplenocitos en células de murino mediante la incorporación al DNA de (3H)timidina(3H-TdR). Los resultados mostraron que éstas tuvieron un efecto mitogénico significativo sobre células de linfocitos en murinos normales. Las tres saponinas provocaron un incremento significativo con la incorporación de 3H-tdR en los timocitos, en comparación con las células control. Sin embargo, las tres sustancias tuvieron menor actividad sobre los esplenocitos que sobre los timocitos. Al mismo tiempo y con base en la influencia de las tres saponinas sobre linfocitos activados con mitógenos o aloantígenos, se evaluaron sus propiedades inmuno-estimulantes observándose que poseen un efecto sinérgico con ConA sobre la activación de los timocitos y con los liposacáridos sobre la activación de esplenocitos. Finalmente se evaluó el efecto de los mimonósidos A y B sobre la proliferación celular de los fibroblastos de ratón (LMTK) y de humano, demostrándose propiedades citotróficas, estos efectos se han utilizado para explicar el uso tradicional de la corteza como cicatrizante de la piel (Anton y cols., 1993).

Por otra parte, Domínguez y col. (1989), reportaron la identificación en la misma planta de dos chalconas: las kukulkaninas A y B, aisladas a partir de material vegetal proveniente de las ramas del árbol. No hay estudios farmacológicos sobre estos productos.

#### d. Aspectos biotecnológicos.

Debido al gran interés comercial y científico en torno al desarrollo de un fitofármaco a base de corteza de tepescohuite y al hecho de que este material se obtiene de árboles silvestres, se buscaron métodos para contar con

la materia prima necesaria a partir de otras fuentes que no pongan en riesgo la sobre vivencia de la especie.

Investigadores del Centro de Investigación Biomédica del Sur, en el IMSS, realizaron estudios para obtener por cultivo celular, callos a partir de los cuales se realizó la propagación *in vitro* de la especie. Estas plantas son cultivadas buscando su control, mejoramiento genético y la producción de plantas en gran escala (Villarreal y col., 1996). El estudio biotecnológico utilizando ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (KN) en cultivos celulares de diferentes explantes de plántulas de *M. tenuiflora* (hipocótilo, cotiledón, raíz, tallo y hoja) se realizaron para determinar las concentraciones óptimas requeridas para la obtención de un callo de máximo rendimiento que permita la propagación exponencial de la especie. Los hipocótilos y los cotiledones resultaron ser los explantes idóneos para la formación y crecimiento del callo originando un material compacto y friable (el término friable se emplea para describir la capacidad de separación de las células, es decir, que éstas se disgreguen fácilmente después de una división celular). La concentración promedio de 2,4-D y KN que permitieron la obtención de callos de esta partes con el mayor peso seco fue de 2.0 mg l<sup>-1</sup>.

También se ha investigado la presencia de DMT en los cultivos de callos de *Mimosa tenuiflora* concluyéndose que este compuesto presente en la corteza es producido por la planta de manera fisiológica y no como consecuencia del proceso de tostado o calentamiento al que es sujeta para propósitos medicinales (Nicasio, 1995).

La aplicación de éstas técnicas biotecnológicas en la investigación de fármacos de origen vegetal, permitió adquirir experiencia en la utilización de cultivos de células (callos) de plantas medicinales capaces de producir *in vitro* los principios activos de interés farmacológico (Villarreal y col., 1993). Se

demonstró que estas células autótrofas en cultivo, aptas para vivir en medios diferentes a los del *hábitat* original de los vegetales, al ser manipuladas biotecnológicamente pueden modificar su producción de metabolitos secundarios de acuerdo a las necesidades del modelo experimental farmacológico (Fowler, 1990; Hall, 1990).

#### e. Los Sistemas de Liberación de Fármacos

En los últimos años, los avances científicos alcanzados en materia de biotecnología han permitido el desarrollo de nuevos métodos físicos y químicos para el diseño de formas de tratamiento nuevas con medicamentos que son administrados al organismo de manera no convencional. Una nueva forma de administración de fármacos son los llamados ‘sistemas de liberación de fármacos’ (*Drug Delivery Systems*), cuyo propósito es proporcionar en forma permanente y gradual sustancias biológicamente activas a humanos y animales recurriendo a diversas modalidades tecnológicas. Así por ejemplo, la necesidad de sustituir un órgano o un tejido dañado por uno sano, mediante implantación de porciones de órganos o células que proporcionen los elementos necesarios para el buen funcionamiento del organismo (Hoffer y col., 1995; Davalli y col., 1995; Faustman y col., 1995) derivó en la búsqueda de modelos que permitan administrar la sustancia activa en el sitio y en las concentraciones y tiempos requeridos por el receptor o huésped. Esto incluye modificaciones químicas al fármaco; por ejemplo, el medicamento es envuelto en pequeñas vesículas que son inyectadas al torrente sanguíneo o dentro de materiales poliméricos (bombas) que pueden ser colocados en lugares específicos del organismo.

Un fármaco puede ser alterado químicamente de manera selectiva, es decir, modificando sus propiedades de biodistribución, farmacocinética, solubilidad u ontogenicidad. Un ejemplo de esto son los fármacos que son diseñados para atravesar una barrera impermeable, modificando su solubilidad, haciéndolos más lipofílicos o uniéndolos a una molécula que tenga un mecanismo específico de transporte.

También se ha recurrido al uso de células que son unidas a macromoléculas específicas como son las proteínas, los polisacáridos o polímeros sintéticos degradables. Los polímeros como el polietilenglicol (PEG), protegen a los fármacos de que sean dañados físicamente por la acción enzimática o por células específicas como los macrófagos. El diseño de novedosos fármacos va acompañado del uso de sustancias combinadas, por ejemplo, existen observaciones clínicas realizadas con la PEG-uricasa, sustancia que reduce las concentraciones séricas de los uratos en pacientes con hiperuricemia y gota; la PEG-asparaginasa que ha sido utilizada en pacientes con leucemia o la PEG-adenosina deaminasa que se ha utilizado en pacientes con inmunodeficiencia combinada severa.

De igual manera, la literatura sobre este tema indica que se han ensayado diversas técnicas de implante, entre las que se encuentran por ejemplo: el uso de microesferas conteniendo el fármaco que son colocadas en el órgano 'blanco' (Okuda y col., 1995); la utilización de colágena o polímeros mucoadhesivos para envolver un fármaco formando una pequeña 'bomba de difusión' que es implantada en el tejido (Geghardt y col., 1995; Leussen y col., 1995) o bien, el uso de liposomas y virosomas acarreadores de macromoléculas biológicamente activas que se introducen en el organismo mediante diversos procedimientos (Grimaldi y col., 1995).

Los sistemas de liberación prolongada de fármacos liberan los productos en un rango predeterminado por un periodo de tiempo definido. En general, el rango de liberación está determinado por el diseño del sistema y son casi independientes de las condiciones ambientales internas. Estos sistemas también pueden liberar fármacos por períodos grandes de tiempo (días o años), como es el caso de las vesículas o macromoléculas conjugadas pueden prolongar la liberación, si bien, el control óptimo está dado por el tipo de material en donde se incluye el fármaco, por ejemplo, en un material polimérico.

La liberación de fármacos mediante bombas de liberación depende también de los mecanismos de difusión, de reacciones químicas y de la activación de los solventes que contiene. De ahí que existan dos tipos de sistemas de difusión controlada: los de reservorio y los de matriz. El control químico está determinado por la velocidad de degradación polimérica o por un 'espacio químico' que el fármaco ocupa en el polímero. La activación del solvente depende de la expansión o hinchamiento del polímero o bien la activación ocurre por efectos osmóticos.

Uno de los primeros estudios clínicos de los sistemas poliméricos de liberación de fármacos se aplicó en la terapia de los pacientes con glaucoma. En este ejemplo, se administra poliacrilato (20 o 40  $\mu\text{g/hr}$ ) continuamente durante una semana lo que permite controlar la presión intraocular con dosis bajas del producto y pocos efectos colaterales. También, han sido probados clínicamente sistemas de liberación de esteroides contraceptivos, que se clasifican en cuatro tipos: 1) implantes subdermales compuestos por polímeros no degradables que liberan el producto durante cinco años (Norplant); 2) implantes subdermales o microesferas degradables inyectables (ácido láctico, copolímeros, policaprolactonas o colesterol), 3) liberación intrauterina de

esteroides por un período de un año y 4) anillos vaginales con un tiempo de duración de 3 a 6 meses (Langer, 1990).

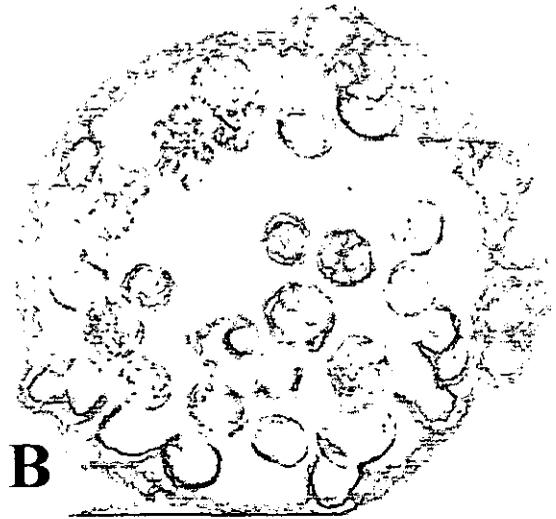
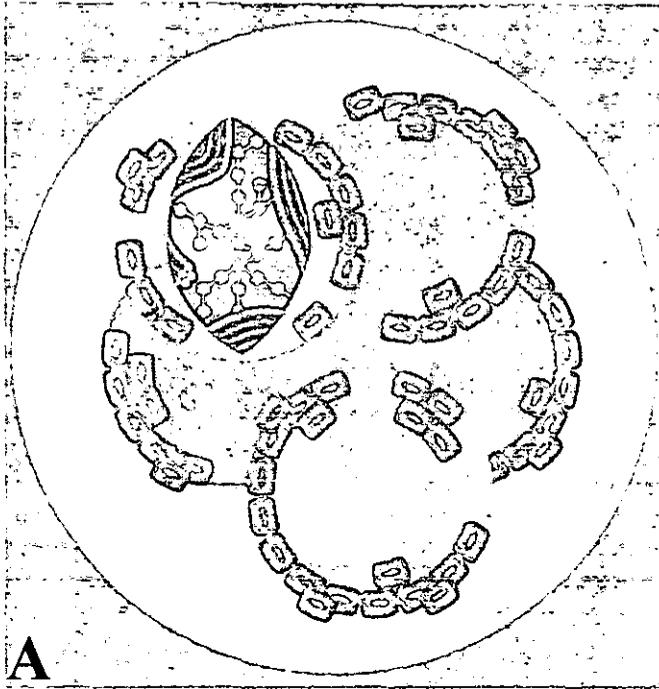
Actualmente, un gran número de sistemas de liberación aún se encuentra en estudio, por ejemplo, la administración de dopamina o bromocriptina para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y el uso de betanecol para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Se han llevado a cabo, también, modelos de trasplante intracerebral para tratar la enfermedad de Parkinson, en los que se utilizan células secretoras de dopamina, provenientes del mesencéfalo y de la médula adrenal de embriones, en lo que se observa alivio de los síntomas. También se ha reportado que las cápsulas de un copolímero de acrílico cuando son implantadas en el cerebro de ratas producen una mínima reacción del tejido del hospedero valorada con técnicas de inmunocitoquímica.

Otras técnicas emplean membranas semipermeables poliméricas con un peso molecular de 50,000 daltons que permiten la libre difusión de los nutrimentos, factores de crecimiento y neurotransmisores, pero además proveen de inmunoprotección contra las inmunoglobulinas y células del hospedero que atraviesan la barrera de difusión. Existen estudios que han evaluado los sistemas de encapsulamiento y su sobrevivencia por un tiempo prolongado, así como de los fenómenos de inmunoprotección de las líneas celulares secretoras, por ejemplo, las de dopamina (PC12, células de la rata que sintetizan, almacenan y liberan grandes cantidades de dopamina). Los trabajos experimentales *in vitro* que se han llevado a cabo con células para ser trasplantadas demuestran su viabilidad por tiempos prolongados y la retención de su fenotipo bajo condiciones de encapsulamiento. En tales casos, las células se mantienen bajo condiciones *in vitro* por un período de seis meses; se realiza un análisis morfológico por microscopía de luz en los diferentes

tiempos de incubación, revelando la presencia de células íntegras y con mucha actividad mitótica en los períodos estudiados (4, 8 y 12 semanas). También se observa que en estos procedimientos puede ocurrir la muerte celular en el material encapsulado, cuando este se encuentra principalmente localizado en el centro de la cápsula y se explica como resultado de un limitado transporte o difusión de nutrimento y oxígeno. Existen numerosos estudios *in vivo* que prueban la capacidad de las células encapsuladas de sobrevivir después de la implantación en el hospedero. Dependiendo de la presencia de tirosina hidrolasa, las células encapsuladas muestran capacidad para sintetizar dopamina (DA) y de atravesar la pared de la cápsula dentro del medio que lo rodea, los mismos resultados se observaron en las células *in vitro*. La liberación espontánea de DA se detectó después de dos semanas de la encapsulación y alcanzó una meseta después de 2 a 3 meses con un promedio de liberación aproximado de 400 mg por día. Hay evidencias de células encapsuladas que han sido mantenidas por seis meses *in vitro* y en donde sus niveles de liberación de DA se determinaron por perfusión. La información de los estudios *in vivo*, demostró que la cápsula conteniendo células implantadas dentro del tejido estriado en cobayos adultos podría presentar rompimientos acompañados de una intensa reacción inmune con la infiltración de abundantes linfocitos dentro y alrededor de la membrana polimérica y que las células no vivas de PC12 fueron visibles en el lumen de la cápsula (Aebischer y col., 1991).

Por otra parte, fue en México donde se iniciaron los trasplantes de tejido suprarrenal al núcleo caudado del cerebro en pacientes con enfermedad de Parkinson, con la finalidad de proveer el metabolito requerido para el adecuado funcionamiento de Sistema Nervioso Central. Estos estudios

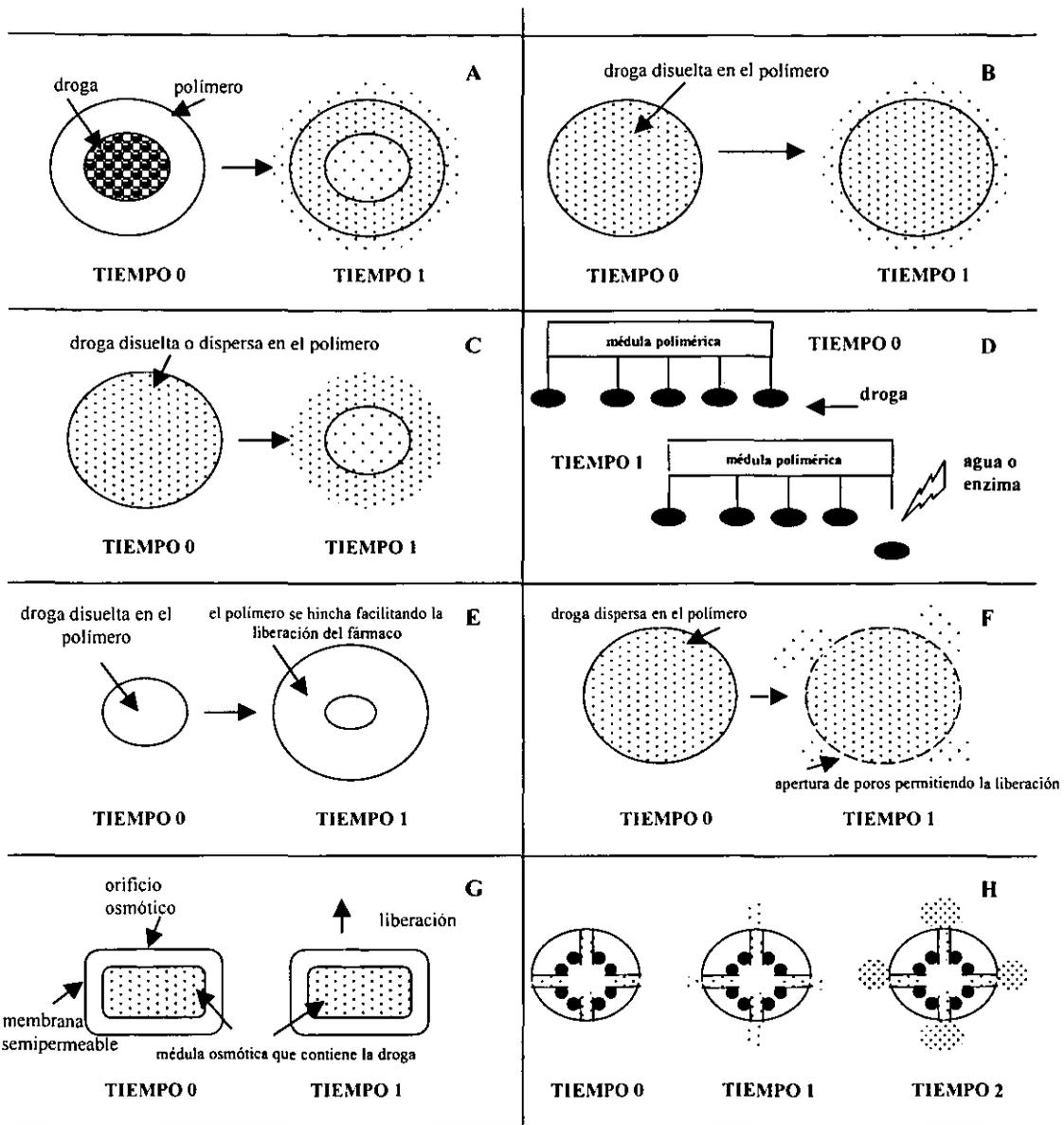
plantearon la posibilidad de utilizar directamente las células como microelementos productores de la sustancia biológicamente activa.



**Figura 2.** Ejemplificación del mecanismo de acción de los microacarreadores como vehículo para la liberación de los hepatocitos.

**A.-** los microacarreadores se encuentran contenidos dentro de una cápsula elaborada con alginato-poli-L-lisina. La microencapsulación celular ha sido utilizada para prolongar la supervivencia y funcionalidad de los hepatocitos trasplantados.

**B.-** la microfotografía muestra la salida de los microacarreadores a la superficie de la microcápsula y posteriormente al órgano blanco.



**Figura 3.** Las imágenes muestran los diferentes mecanismos de liberación de la droga en los sistemas de biobombas. En general, el mecanismo más común es el de difusión, es decir, la droga migra de una posición inicial en el sistema polimérico a la superficie y de ahí al organismo. La difusión puede ocurrir a través de un reservorio:

- A.- el sistema está constituido por un núcleo en donde se encuentra contenida la droga el cual a su vez está cubierto por un polímero.
- B.- la droga se encuentra uniformemente distribuida en un sistema polimérico.
- C.- la droga es liberada por la degradación del sistema polimérico.
- D.- la droga se encuentra unida a una columna polimérica y es separada por la acción química del agua o de una enzima.
- E.- el agua permea en el sistema polimérico en donde se encuentra contenida la droga provocando que el polímero se hinche liberando así el compuesto.
- F.- la presión osmótica ocasiona la apertura de poros en el sistema polimérico y en consecuencia la salida del compuesto.
- G.- existen sistemas osmóticos que pueden proveer una constante liberación. Este sistema está formado por una médula osmótica (agua+droga) cubierta por una membrana semipermeable la cual posee un orificio de liberación osmótica por donde es liberada la droga.
- H.- algunos sistemas poliméricos pueden ser externamente activados de acuerdo a las necesidades del organismo, utilizando fuerzas magnéticas, es decir, un campo magnético externo que provoque que las esferas embebidas en el polímero hagan presión sobre el sistema, expulsando la droga a través de los poros.

## f. Los Trasplantes Planta-Animal.

Con base en todos estos antecedentes y ante la necesidad de desarrollar nuevas líneas de investigación para resolver algunos de los problemas técnicos inherentes a la utilización en sistemas de liberación de fármacos con células productoras de sustancias medicinales, se ha propuesto la utilización de células vegetales (cultivadas *in vitro*) como elementos productores de los metabolitos útiles para el organismo animal deficiente. Es decir, se ha sugerido la posibilidad de que los conjuntos de células de plantas medicinales, que son productoras de sustancias biológicamente activas, pudieran ser utilizadas como ‘sistemas biológicos de liberación de fármacos’ si lograsen ser implantados en un organismo animal y permanecer funcionalmente viables durante un tiempo útil.

En esta línea de investigación, se publicó un primer trabajo desarrollado por Lozoya y col. (1995a), en el que utilizaron cultivos celulares de *Mimosa tenuiflora* que fueron exitosamente trasplantados en animales de laboratorio. Como conclusiones de esta primera observación se planteó que: “*desde el punto de vista farmacológico, el modelo de trasplante inter-regni (entre reinos) abre un espacio de estudio dentro del novedoso campo de los métodos de liberación lenta de medicamentos, al abrirse la posibilidad de que los trasplantes vegetales de plantas medicinales puedan formar parte del diseño de bio-bombas de liberación de fármacos, implantadas en determinados lugares del organismo animal, lo que pudiera tener ciertas ventajas prácticas*”. Frente a la inesperada realidad de que las células vegetales no fueran rechazadas por el huésped animal, en el que permanecieron durante varias semanas, los autores mencionan que: “*...se plantea la posibilidad de que la célula vegetal injertada en el organismo animal se encuentre*

*secretando ciertos factores químicos propios que sean capaces de modificar la respuesta inmunológica del receptor, lo que puede arrojar luz respecto a los medicamentos inmunoreguladores de origen vegetal que están siendo desarrollados en otras partes del mundo.”*

Posteriormente, Lozoya y col. (1995b, 1997), dieron a conocer que un conjunto de células de *Mimosa tenuiflora* implantado bajo la piel de un grupo de ratas de laboratorio, durante mucho más tiempo, se corroboró la observación preliminar de la viabilidad de las células en el medio animal. Según evidencias de tipo histológico, las células vegetales se mantuvieron viables bajo la piel durante 120 días; el conjunto de células permaneció rodeado de una fibrocápsula de colágeno producida por el hospedero y se observó la vascularización del implante. Estas observaciones llevaron a los autores a sugerir la existencia de algún tipo de interacción funcional entre el conjunto celular vegetal y el medio animal. Estudios posteriores han abordado el diseño detallado de las técnicas que se requieren desarrollar para valorar las características anatómicas de las células vegetales a ser implantadas en diversas regiones del organismo animal, durante periodos mayores de tiempo. En todos estos estudios se han utilizado cotiledones de *M. tenuiflora* los cuales fueron sometidos a cultivo *in vitro* para obtener un callo o conjunto celular usado para el trasplante. Es decir, pequeños fragmentos del callo, de aproximadamente 50-70mg, son implantados bajo la piel o en la cavidad peritoneal de las ratas. Se obtuvieron muestras para conocer el estado celular del material vegetal a los 30, 90, 180 y 270 días de haber sido implantado. Cada una de estas muestras fueron sometidas a diferentes pruebas histológicas y sus características se compararon con ejemplares de callo que se mantienen en subcultivo *in vitro* en el laboratorio por el mismo tiempo de observación pero sin realizar renovación de su medio nutricional. Las técnicas aplicadas en

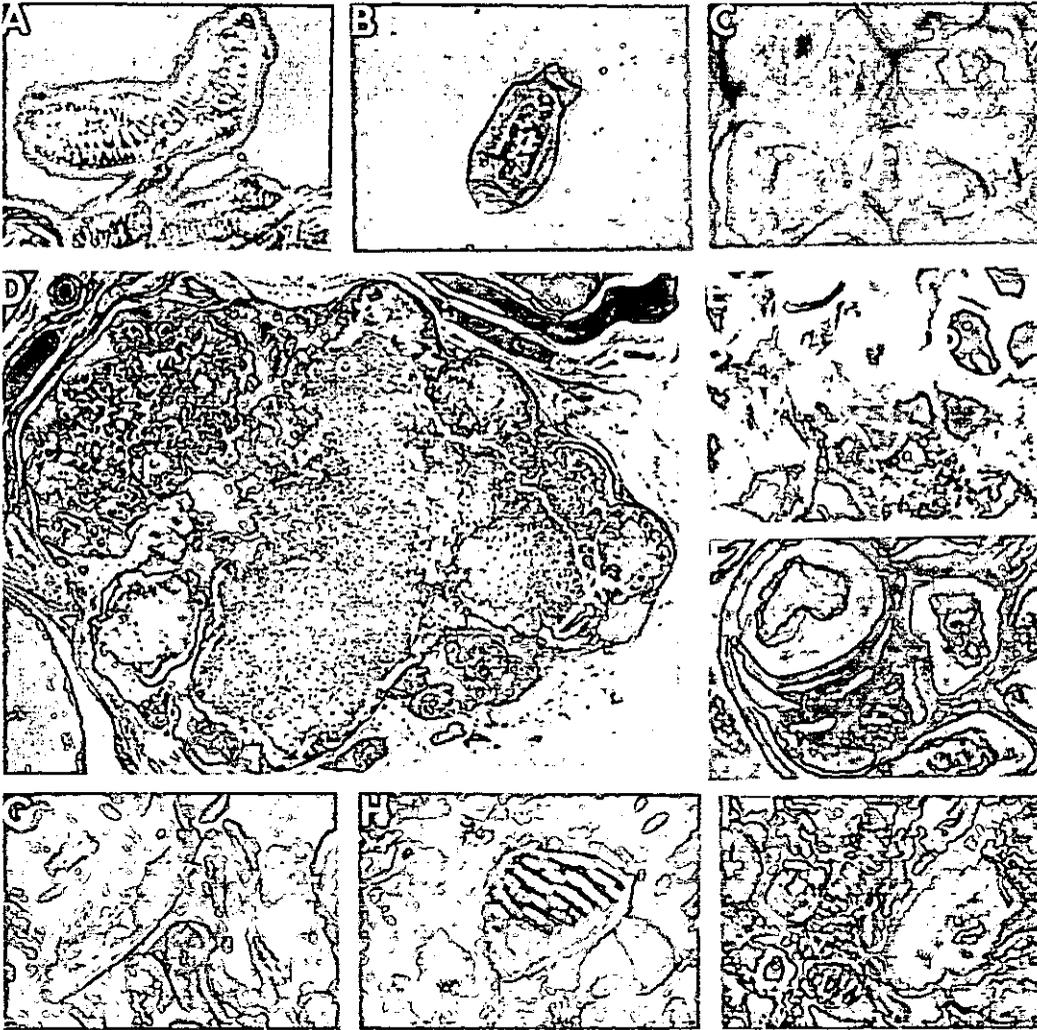
estos estudios fueron la tinción de safranina-fast green, floroglucina-HCL, diacetato de fluoresceína, yoduro de propidio y la técnica de Jeffrey (disociación del tejido) para determinar sus condiciones histológicas y de viabilidad funcional, Rivera-Arce y col. (en prensa).

Los resultados de estas observaciones fueron alentadores en cuanto a la capacidad de las células vegetales de sobrevivir en el medio animal durante largos períodos; sin embargo, se observó que las células vegetales pueden llegar a organizar su propio sistema vascular en el medio animal a partir de los 90 días de permanecer implantadas. Es decir, después del tercer mes, las células iniciaron un proceso de diferenciación, que culminó con la formación de elementos traqueales. Esto sugirió que el implante vegetal utilizado de *Mimosa tenuiflora* estaba constituido principalmente por células parenquimáticas que fueron capaz de diferenciarse al modificarse radicalmente las condiciones originales de cultivo en la que se mantuvieron desdiferenciadas. Los estudios de control mostraron que, habitualmente, en condiciones *in vitro*, las células vegetales no sobrevivieron n más de seis meses en el mismo medio nutricional, el cual al agotarse provocó la aparición en las células de signos de oxidación y la muerte celular, no así los cambios de diferenciación observados en el medio animal.

Por otra parte, las evidencias de tipo histológico del tejido animal en contacto con el implante vegetal, indicaron que no se presentaron alteraciones o signos de infección durante los 270 días de implantado el callo. Se observó una inflamación moderada (presencia de polimorfonucleares y macrófagos) alrededor del tejido vegetal, que a diferencia de los trasplantes animal-animal no destruyó el tejido implantado. La infiltración que se observó durante los primeros tres meses, disminuyó en el tiempo subsecuente dando paso a un gradual encapsulamiento por fibrinógeno. Al mismo tiempo, se detectó la

formación de trabéculas que contenían capilares que atravesaron el implante, vascularizándolo. Al mes de implantado el tejido vegetal en la cavidad peritoneal se formó una fibrocápsula que, aparentemente no impidió la adquisición de nutrientes para el conjunto celular vegetal. Los implantes subcutáneos se caracterizaron por la formación de una fibrocápsula de colágeno más gruesa que, aparentemente, tampoco impidió la sobrevivencia del conjunto celular vegetal. Los estudios histológicos del material vegetal que se utilizó para los implantes (callo producido a partir de explantes de cotiledón), mostraron que estaba formado por tres tipos de elementos: células parenquimáticas, tejido vascular y células meristemáticas. Estudios paralelos indicaron la presencia de N,N-dimetiltriptamina según se determinó en muestras obtenidas a los 9 meses de haber sido implantadas.

Estos resultados plantearon la necesidad de conocer con más detalle la anatomía del cultivo celular del material vegetal que pretende ser implantado en el medio animal y, sobre todo, la importancia de desarrollar un método que permita generar selectivamente un tejido celular homogéneo, formado en su mayoría por células productoras de metabolitos bioactivos.



**Figura 4.** Microfotografías que ilustran las características anatómicas de los diferentes periodos de implantación de *M. tenuiflora* dentro de la cavidad peritoneal de la rata.

**A.-** elementos de vaso obtenidos a partir de la disociación del cotiledón de *M. tenuiflora*.

**B.-** células parenquimátosas disociadas a partir del cotiledón.

**C.-** células parenquimáticas de los cultivos celulares in vitro (4 semanas de cultivo).

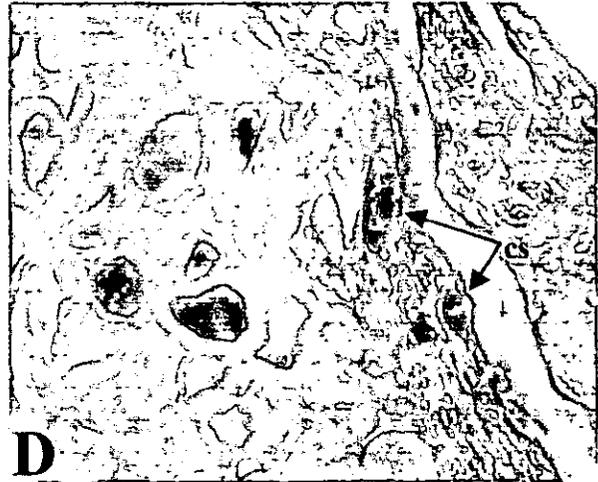
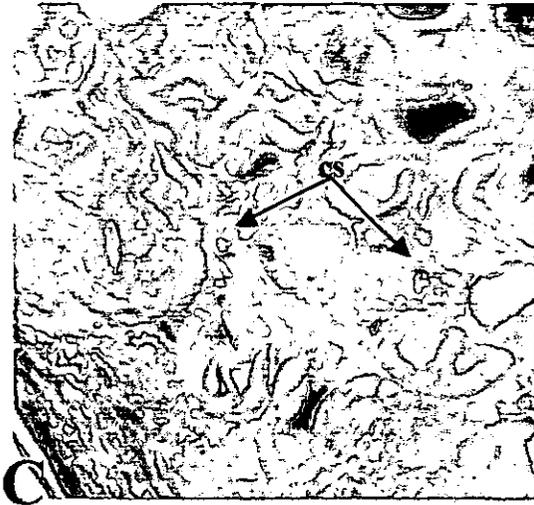
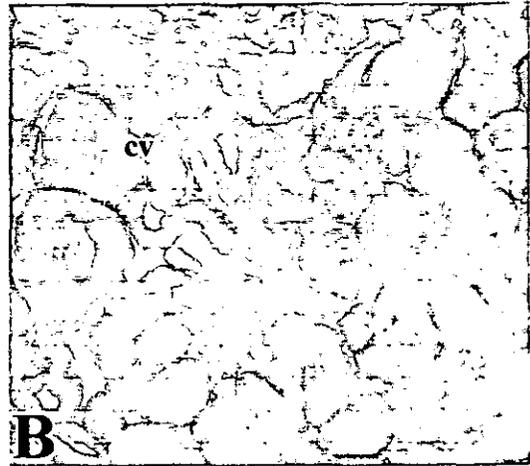
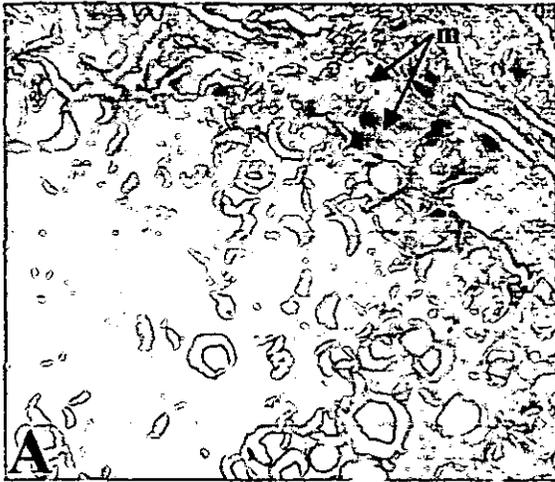
**D.-** vista panorámica de las células vegetales implantadas en la cavidad peritoneal de la rata después de un período de 30 días: c-cápsula de fibrinógeno, p-células parenquimáticas, a-células polimorfonucleares, v- vasos sanguíneos, ip-peritoneo intestinal.

**E.-** ampliación del mismo implante vegetal mostrando la integridad de las células vegetales y la presencia de eritrocitos(v).

**F.-** células vegetales a los 90 días de implantadas.

**G.-** células vegetales a los 180 días de implantadas en donde se observa el inicio de la diferenciación identificado por dos procesos: un alargamiento en el tamaño y la lignificación de las paredes celulares.

**H e I.-** formación de elementos de vaso a los 270 días del implante vegetal. Notese la presencia de capilares sanguíneos y eritrocitos (>).



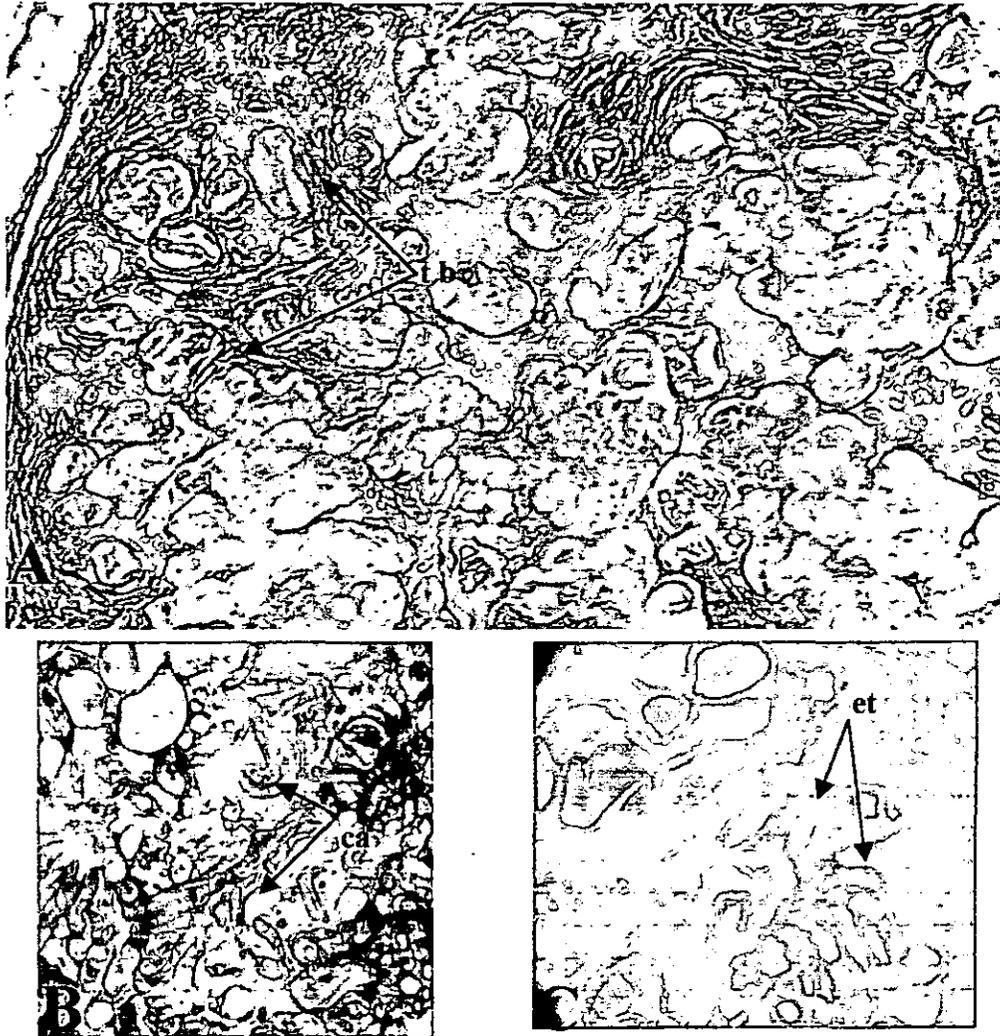
**Figura 5.** Serie de microfotografías que ilustran el comportamiento del tejido animal después de un implante de células vegetales de 30 días en el peritoneo intestinal de la rata.

A.- reacción inmunológica de las células polimorfonucleares y macrófagos(m).

B.- células vegetales implantadas(cv).

C.- infiltración de capilares y presencia de eritrocitos(cs) en el interior del implante vegetal

D.- presencia de capilares(cs) en la periferia del implante



**Figura 6.** Características anatómicas de las células vegetales a los 90(A), 180 y 270 días de implantadas en el animal(C).

A.- formación de travéculas(fibras de colágena) rodeando las células vegetales(Tb), característica observada cuando los implantes se realizaban con células disgregadas.

B.- inicio de la diferenciación celular (células alargadas) en los implantes vegetales(ca)

C.- presencia de elementos traqueales(et) en las células implantadas.



**Figura 7.** Viabilidad de las células vegetales con diacetato de fluoresceína.

**A.** - viabilidad de las células vegetales después de 30 días de implante.

**B.** - viabilidad de los cultivos celulares *in vitro*.

### g. Planteamiento del trabajo.

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación básica multidisciplinaria que se realiza en el Laboratorio de Fitofármacos, de la Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas, del Instituto Mexicano del Seguro Social, para continuar y ampliar las observaciones sobre la utilización de células vegetales como elementos de sistemas de liberación de fármacos.

El diseño y organización del presente trabajo se limitó a lograr la obtención de callos de *Mimosa tenuiflora* constituidos por células idóneas, es decir, esencialmente por células parenquimáticas capaces de producir el principio activo N,N,dimetiltriptamina para ser utilizadas en el diseño de un sistema experimental de liberación de fármacos. Una vez obtenido este material celular, será sometido a otros estudios que comprenden, en términos generales, el encapsulamiento enriquecido con un medio nutritivo y reguladores de crecimiento que mantengan el estado idóneo de las células (Jiménez y Quiala, 1998). y potencien la producción de las sustancias químicas deseadas, las cuales serían excretadas al exterior de la célula y de la cápsula hasta alcanzar la célula u órgano blanco. Los siguientes estudios estarán encaminados a la aplicación de este sistema experimental en animales de laboratorio, es decir, su implantación en un órgano blanco, la evaluación del efecto farmacológico y la identificación del principio activo y sus metabolitos en el torrente sanguíneo y en la orina.

## II. Objetivos.

### a. Objetivo general.

Analizar anatómicamente la composición celular de los callos obtenidos a partir de explantes de ápice, tallo, raíz y hoja de plántulas de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret, que sean productores de N,N-dimetiltriptamina y con un mínimo grado de diferenciación.

### b. Objetivos específicos.

- Generar callos friables de células parenquimáticas, a partir de cada uno de los tejidos seleccionados.
- Identificar mediante técnicas histoquímicas los principales compuestos presentes en los explantes y en los callos: saponinas, taninos, alcaloides, taninos y almidón.
- Identificar y cuantificar el contenido de N,N-dimetiltriptamina en los callos obtenidos.
- Seleccionar el callo idóneo para su utilización en los sistemas de liberación de fármacos.

### III. Material y Métodos.

a. Colecta de las semillas: las semillas se colectaron en Xochitepec, Morelos, de árboles mantenidos en el Jardín del Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS. Las semillas se limpiaron y se seleccionaron para obtener un material libre de contaminación.

b. Germinación: las semillas se desinfectaron colocándolas en etanol de 96% durante tres minutos; a continuación se lavaron tres veces con agua bidestilada (previamente esterilizada) y se colocaron en una solución al 10% de hipoclorito de sodio durante 15 minutos. El material se lavó nuevamente por cinco veces con agua bidestilada. Las semillas desinfectadas se colocaron en una caja de *Petri* y se escarificaron con un bisturí; se les adicionó agua y se dejaron remojando durante 24 horas, después de lo cual nuevamente se lavaron y se colocaron en frascos esterilizados de 125 ml, conteniendo medio Knop. La germinación se realizó en un cuarto incubador bajo temperatura ( $28\pm 2^\circ$  C) y luz controlada (fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad).

c. Obtención de las plántulas: bajo condiciones estériles se procesaron plántulas para separar los diferentes explantes: ápice, hoja, tallo y raíz, los cuales se sometieron a desdiferenciación celular para la inducción de callo. Las plántulas utilizadas para este proceso tenían tres semanas de germinación y median en promedio una altura de 15 centímetros.

d. Inducción de los callos: todos los explantes se colocaron por separado en frascos de 125ml que contenían 20 ml de medio Murashige y Skoog (MS), adicionado con sacarosa (30 g/l), solución inorgánica (100ml/l), solución orgánica (10ml/l), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2mg/l) y cinetina (2mg/l); se ajustó a un pH de 5.7, y sostenido en agar (8g/l) siendo esterilizado en autoclave (15 minutos) según técnica de Villareal, et al (1993). Los cultivos se mantuvieron en un cuarto incubador a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ \text{C}$  y a un fotoperíodo de 16 horas. Cada cuatro semanas de cultivo, los callos se transfirieron a un medio fresco, manteniéndose las mismas condiciones de incubación.

e. Procedimientos para el análisis anatómico-histoquímico: se tomaron al menos tres muestras de cada callo procedentes de los diferentes explantes: ápice, hoja, tallo y raíz, durante cada subcultivo, es decir, cada tres semanas hasta la semana 21. Se utilizó una solución fijadora FAA en la que cada uno de los tejidos se conservó durante 24 horas. Posteriormente, el tejido se deshidrató mediante una serie gradual de etanol desde 30% hasta 100%, permaneciendo 30 minutos en cada solución (Curtis, 1986).

Para realizar la inclusión de los fragmentos se utilizó paraplast de punto de fusión  $56-57^\circ \text{C}$ . La impregnación del tejido en paraplast se realizó de la siguiente manera: la muestra se colocó en etanol absoluto-xilol (1:1) durante 30 minutos; después en paraplast-xilol, por 24 horas; y en paraplast líquido, por otras 24 horas. En los dos últimos pasos las muestras se mantuvieron en una estufa a una temperatura de  $56^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$  (Curtis, 1986).

Se colocó y se orientó cada espécimen dentro de un molde al agregar paraplast y se dejaron secar los bloques durante 24 horas y posteriormente llevó a cabo los cortes en microtomo tipo Minot. Se obtuvieron cortes de

15µm de grosor, que se colocaron en un baño de flotación (preparado con gelatina 0.5 g/l) a una temperatura de 45°C. Una vez que se extendieron los cortes en un portaobjeto se les dejó secar para continuar con la eliminación del paraplast. Los porta objetos se colocaron en una estufa a 56°C durante 24 horas, posteriormente se pasaron en xilol por 10 minutos y después a otros dos cambios de 5 minutos cada uno. La identificación estructural del tejido y las células obtenidas *in vitro* se realizó empleando la técnica de Safranina - Fast green. A continuación se llevó a cabo la hidratación del material mediante una serie gradual de etanol que comenzó con etanol absoluto-xilol (1:1) durante tres minutos, etanol absoluto y continuó sucesivamente hasta 30 % y agua corriente. Las muestras se colorearon en una solución de Safranina por 24 horas, se enjuagaron con agua corriente sometiéndose a una serie gradual de etanol 30% hasta etanol al 96%, las muestras se colocaron durante 50 segundos en verde rápido e inmediatamente a etanol 96% hasta xilol. A continuación se realizó el montaje de las preparaciones en resina sintética, estas se dejaron secar en la estufa por 24 horas y se limpiaron con xilol; se observaron al microscopio (Ruzin, 1999). Los ejemplares fueron estudiados bajo microscopía de luz y con las técnicas de contraste de fases y bajo luz ultravioleta.

Las pruebas de histoquímica para la identificación y localización de los grupos químicos de importancia medicinal fueron: saponinas, alcaloides y taninos. Mediante la aplicación de estas pruebas histoquímicas llevo a cabo una detección rápida de los compuestos de interés como método de control cualitativo de los callos o del material que será utilizado para el sistema de biobombas.

**Saponinas y Taninos.-** Se utilizó material fresco para obtener secciones de 30 micras de grosor; en cada muestra se aplicó una gota de una solución acuosa de ácido sulfúrico al 40%. Después de 15 minutos se colocaron las laminillas en una solución saturada de hidróxido de bario durante 24 horas, se lavaron en una solución débil de cloruro de calcio y finalmente se pasaron a una solución acuosa al 10% de bicromato de potasio; nuevamente se enjuagaron y se observaron al microscopio (Johansen, 1940).

**Alcaloides.-** Secciones de 15 micras de espesor, se colocaron en una solución de ácido tartárico al 5% en alcohol etílico de 95% durante 48 horas (Johansen, 1940).

**Lignina.-** Las secciones desparafinadas fueron tratadas con unas gotas de fluoroglucina seguido de unas gotas de HCl al 25% en agua destilada. Se colocó un cubreobjetos y se observó (Johansen, 1940).

**Almidón.-** Las secciones se colocaron en una solución de yoduro de potasio durante 15 minutos y se observó al microscopio (Johansen, 1940).

f. Método de HPLC para N,N-dimetiltriptamina (DMT): se liofilizaron callos de los diferentes explantes con una edad de 21 semanas de cultivo. El peso seco correspondiente fue el siguiente: callo-raíz, 0.85 g; callo-ápice, 0.64 g; callo-hoja, 0.28 g; callo-tallo, 0.80 g. Cada una de las muestras se maceró en metanol durante 72 horas. Después de este tiempo, los extractos se colocaron en un rotavapor y el residuo se resuspendió en 1 ml de metanol y filtró a través de una membrana de 0.45 micras. La identificación DMT, se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) siguiendo la técnica descrita anteriormente por Nicasio (1995).

#### IV. Resultados y Discusión.

Después de un periodo de 10 días de incubación se obtuvieron plántulas de *M. tenuiflora*, este material aséptico, se utilizó para obtener los diferentes explantes que fueron utilizados para el cultivo celular. Los callos obtenidos presentaron las siguientes características.

##### *a. Características macroscópicas generales de los cultivos celulares (callos).*

En las primeras dos semanas de cultivo, todos los explantes desarrollaron algunas protuberancias: tricomas y brotes de tallo, los tricomas de consistencia porosa, de color blanco con pigmentaciones rojas; características de un proceso de dediferenciación incompleto. Se observó a partir de la cuarta semana que en algunas zonas de los explantes se inició la formación de callo.

Sin embargo, se observó que si los callos permanecían en el medio sin ser transferidos a medio fresco durante cuatro semanas, algunas zonas celulares presentaban oxidación y en consecuencia se producía muerte celular. Por ello se decidió realizar los subcultivos a partir de la tercera semana y cada tres semanas, hasta la semana 21 en la que finalizó la toma de muestras para la evaluación de callo. A partir de la semana 12 se observó el establecimiento total del callo, es decir, morfológicamente se obtuvo una masa celular libre de tejido diferenciado.

Durante la obtención del callo se caracterizaron diferentes etapas de desarrollo. De acuerdo a Lindsey y Jones (1989), ha reportado diferentes estadios una *etapa reposo* en donde se inicia una serie de procesos metabólicos que preparan a la célula para la mitosis. Este período se caracterizó por una dediferenciación incompleta. Posteriormente la *etapa de división celular*, durante esta etapa la prioridad es una división celular acelerada y constante de tal manera que hay un retraso en el aumento de

tamaño de la célula. Anatómicamente son células pequeñas, de vacuolas pequeñas, con poca acumulación de metabolitos secundarios en tanto que la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos es elevada, se observan células densas. Fue a partir de la cuarta semana cuando aparentemente no se observaba tejido, sin embargo, a la semana 12 se observó un establecimiento de la masa celular caracterizada por poseer un volumen considerable a esta última etapa se le conoce como *etapa estacionaria* que se diferencia por una disminución de las tasas de división celular, actividad respiratoria, síntesis de RNA y proteínas y por un aumento en la proporción de células vacuoladas. Es decir, se finaliza la división celular y comienza un aumento considerable en la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios: alcaloides, antocianinas, antraquinonas y derivados fenólicos. Los estadios mencionados anteriormente se observaron en los diferentes subcultivos de los callos que se obtuvieron a partir de cada uno de los explantes seleccionados. Se puede señalar una relación entre tiempo y acumulación de metabolitos, sobre todo en tallo, raíz y hoja, en donde a mayor tiempo mayor acumulación de material ergástico.

En lo que se refiere a textura y color del callo, se formaron dos tipos de callos:

1. De masa dura, color café y
2. De masa friable, color verde (en ocasiones verde-amarillento).

Álvarez (1987), describe a los callos como conjunto de células en continua proliferación, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido. Esta misma masa de células puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular. Algunos callos son masas celulares compactas y duras con células íntimamente unidas, mientras que otras forman tejidos esponjosos con gran cantidad de espacios intercelulares. El tipo y grado de pigmentación

depende de varios factores, tipo de explante, factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etc.

El *ápice*, fue el explante más adecuado para la obtención de callo friable debido a que el inicio de la desdiferenciación tuvo lugar de manera temprana, durante la primera semana de cultivo, obteniéndose un tejido en la mayoría de los casos de color verde y consistencia friable.

Los callos resultantes de los explantes de *hoja*, fueron de tamaño muy pequeño que al momento de manipularlo con las pinzas se dañó y se oxidó, lo que significó una gran dificultad para lograr la desdiferenciación celular durante las primeras semanas, ya que, una parte de los especímenes se oxidaba y otra se lograba desdiferenciar con lentitud. Finalmente se obtuvo un material duro, de color café.

El explante de *raíz* posee pocas ventajas para la obtención del callo, ya que durante las primeras cuatro semanas se oxidó sin lograrse la desdiferenciación. Los especímenes que lograban sobrevivir el período de oxidación lograron desdiferenciarse muy lentamente, entre la 4<sup>a</sup> y 9<sup>a</sup> semanas desarrollaron pequeñas prolongaciones porosas de color blanco con abundante pigmentación roja. El callo obtenido fue verde con algunas partes de color café y de consistencia dura.

*M. tenuiflora* es una planta que se caracteriza por su significativo contenido de derivados fenólicos, éstos se encuentran principalmente en las vacuolas, se mezclan con el contenido de plastidios y otros organelos donde están confinadas las polifenolxidasas y aparece la coloración marrón o negra como consecuencia del proceso de oxidación. Estos compuestos son altamente reactivos e inhiben la actividad enzimática hasta provocar la muerte celular

(Jiménez, 1998), este proceso se presentó principalmente en los explantes de hoja, raíz y tallo.

El material obtenido a partir del *tallo* fue más friable que el de la raíz. También, se presentaron prolongaciones similares a las observadas en la raíz. Finalmente, se obtuvo un callo verde con algunas zonas que presentaron oxidación

De acuerdo a las recomendaciones planteadas para la obtención adecuada del callo, el *ápice* fue el tejido más ventajoso para la obtención de un callo adecuado, es decir, friable y de rápida desdiferenciación (la primera semana de cultivo) esto se debe a que los callos derivados de embriones y plántulas tienen un mayor potencial para la división celular. También es importante el estado fisiológico y la edad de la planta, siendo recomendable utilizar plantas jóvenes y con crecimiento activo que fueron apropiados para inducir la desdiferenciación en esos tejidos morfológicamente más plásticos que los de hoja, raíz y tallo (Jiménez, 1998).

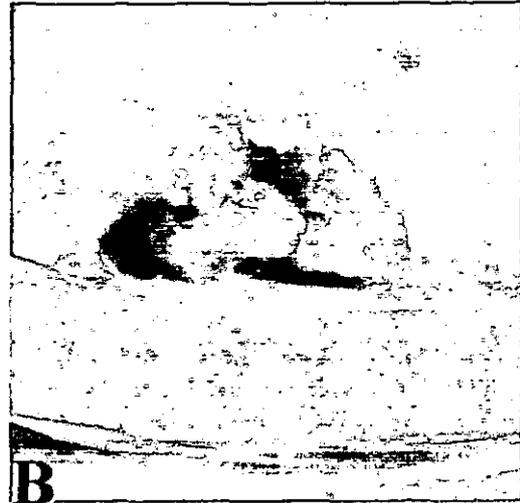
Por otra parte el resto de los explantes como hoja, raíz y tallo presentaban mucha oxidación y por lo tanto poco rendimiento de callo, la hoja es un tejido muy pequeño y frágil que al momento de manipularlo con las pinzas se dañó y se oxidó, lo cual no facilitó el proceso de obtención de callos.



Figura 8. .Plántula de *Mimosa tenuiflora* Poir.



A



B



C



D

**Figura 9.** Características morfológicas de los cultivos celulares (callo) de *M. tenuiflora*.

A y B.- el callo originado a partir de explantes de ápice se caracterizo por poseer una coloración verde amarillenta y de consistencia friable.

C.- El callo-tallo presentaba una coloración verde amarillenta, en ocasiones café y de consistencia friable.

D.- el callo-raíz formaba una masa dura de color café y algunas zonas verdes.

*b. Anatomía de los callos.*

Se observaron cinco tipos de células en cada una de los callos estudiados (callo-ápice, callo-tallo, callo-raíz, callo-hoja):

- 1) Células parenquimatosas polimorfas de pared delgada, vacuoladas y con núcleo y nucleolo evidente.
- 2) Células meristemáticas.
- 3) Células de reserva o almacenamiento de material ergástico
- 4) Células parenquimáticas alargadas
- 5) Elementos traqueales.

El análisis microscópico permitió identificar cinco tipos de elementos celulares, los cuales se encontraron distribuidos en zonas específicas de las secciones estudiadas; las células parenquimatosas con grandes vacuolas (1) y células de reserva o de material ergástico(3) se encontraron en la región superficial del callo, también se identificaron otro tipo de células con contenido rojo que se organizaron alrededor de las células diferenciadas y en la periferia. En cambio, las células alargadas (4) y los elementos traqueales (5) se organizaron en grupos característicos concentrados en la parte interna del callo. También las células pequeñas (2) en continua división se encontraron cerca de las células que estaban diferenciándose. De acuerdo a estudios microscópicos que se han realizado con callos, se ha demostrado que los tejidos de tipo calloso son heterogéneos en su composición celular, es decir, un mismo callo presenta varios tipos celulares. Dicha composición va a depender de diversos factores, como son el origen del explante, la edad de los cultivos y la composición de los medios. Un callo homogéneo está constituido (en su mayor parte) de un solo tipo celular, pero raramente se encuentra, aún cuando se han obtenido cultivos puros de células del tipo parenquimatoso. El callo está generalmente constituido por una alta proporción de células en las

que las vacuolas son predominantes, similares a las células del parénquima; el callo también contiene pequeñas zonas de células en división, que se encuentran localizadas en las áreas periféricas superficiales o dentro del tejido, y que serían centros para la formación de meristemas (apicales), primordios radiculares o embriones incipientes. Estas zonas de división celular generalmente se presentan dando origen a las masas amorfas del tejido aparentemente desorganizado (Álvarez, 1987).

### **i. Ápice.**

*3 semanas de cultivo.* La preparación todavía presentaba restos de tejido diferenciado; el haz vascular al centro del tejido, el cual estaba rodeado de células alargadas y con vacuola de gran tamaño, teñidas en rojo, histológicamente los compuestos que reaccionan con el colorante Safranina son identificados como células con contenido fenólico, en estos casos se observa una acumulación en la vacuola formando gránulos de tamaño grande. A las células que presentan estas características no se les observó núcleo. En estudios anatómicos de callos, obtenidos a partir de embriones inmaduros se identificaron zonas de tejido vascular combinado con tejido parenquimático, observándose en la periferia la presencia de amiloplastos (Gómez, 1998a). En el presente estudio se observaron regiones similares rodeadas por una o varias capas celulares, en el caso del tejido vascular siempre se caracterizó por rodearse de células pigmentadas en rojo es decir, de contenido fenólico tal y como sucede en cortes de raíz en el que el haz vascular se encontró rodeado de células con este tipo de material ergástico como una forma de protección al haz vascular.

*6 semanas de cultivo:* masa celular formada por zonas meristemáticas, localizadas principalmente en la parte central de la muestra. Estas mismas

observaciones se realizaron en callos embriogénicos, se detectaron regiones meristemáticas muy bien organizadas, las cuales se localizaron principalmente en la parte central. También se distinguieron células de gran tamaño, algunas de ellas en división celular, células alargadas que pueden ser restos de tejido diferenciado de la planta y tricomas en la superficie del callo, estructuras epidérmicas características en las muestras que pertenecían a las primeras semanas de cultivo. En estudios histológicos de cultivos de embriones se observaron abundantes protuberancias blanquecinas o de color rojizo, dichas estructuras se identificaron por medio de cortes histológicos como raíces muy pequeñas. Los especímenes del estudio actual mostraron apariencia similar, pero en los estudios anatómicos se identificaron como tricomas glandulares. El desarrollo de este tipo de estructuras se pueden formar como protección al callo y a sus respectivas zonas meristemáticas, como se ha observado en otras plantas, en donde los tricomas surgen del meristemo y las protegen. Además como derivados epidérmicos pueden tener función de protección.

*9 semanas de cultivo:* células alargadas con vacuolas que contenían almidón o cristales poligonales, estudios anteriores mencionan que la corteza de *M. tenuiflora* se caracteriza por su abundante contenido en cristales de oxalato de calcio y almidón (Antón y cols., 1993; Camargo, 1996). También se observaron células que se estaban dividiendo, los núcleos eran evidentes.

*12 semanas de cultivo:* durante esta etapa se inició la diferenciación y organización del tejido vascular en grupos pequeños de elementos traqueales, son células compactas, en forma de paquetes que se van diferenciando, localizadas principalmente en la zona central de la muestra celular, estos conjuntos de células estaban rodeados por células parenquimáticas de gran contenido fenólico teñido de rojo con la safranina, estas mismas células se distribuyeron en la periferia de la muestra, en el parénquima del haz vascular y

en las zonas meristemáticas. Este tipo de células se caracterizan por contener vacuolas de gran tamaño, estas mismas características también son descritas en un estudio anatómico de cultivos de embriones inmaduros de *Zea mays* en donde se describe a dos tipos celulares: 1) células grandes con las características anteriormente descritas (con o sin contenido fenólico) y 2) células meristemáticas (Gómez, 1998b).

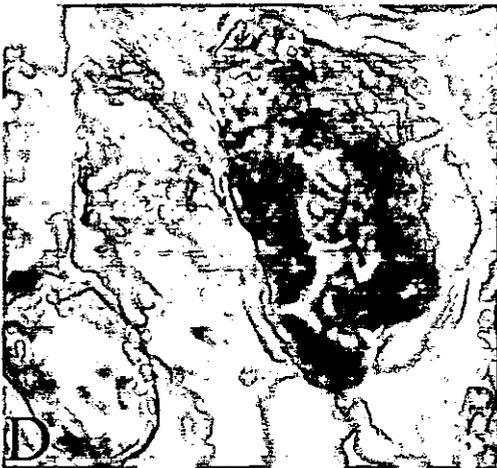
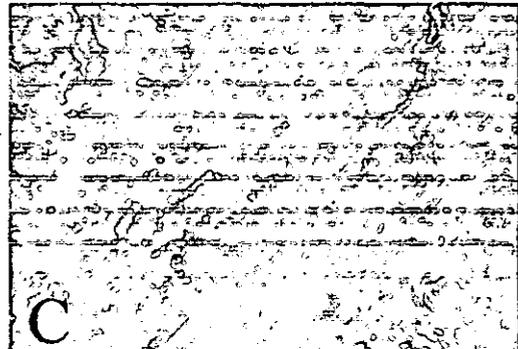
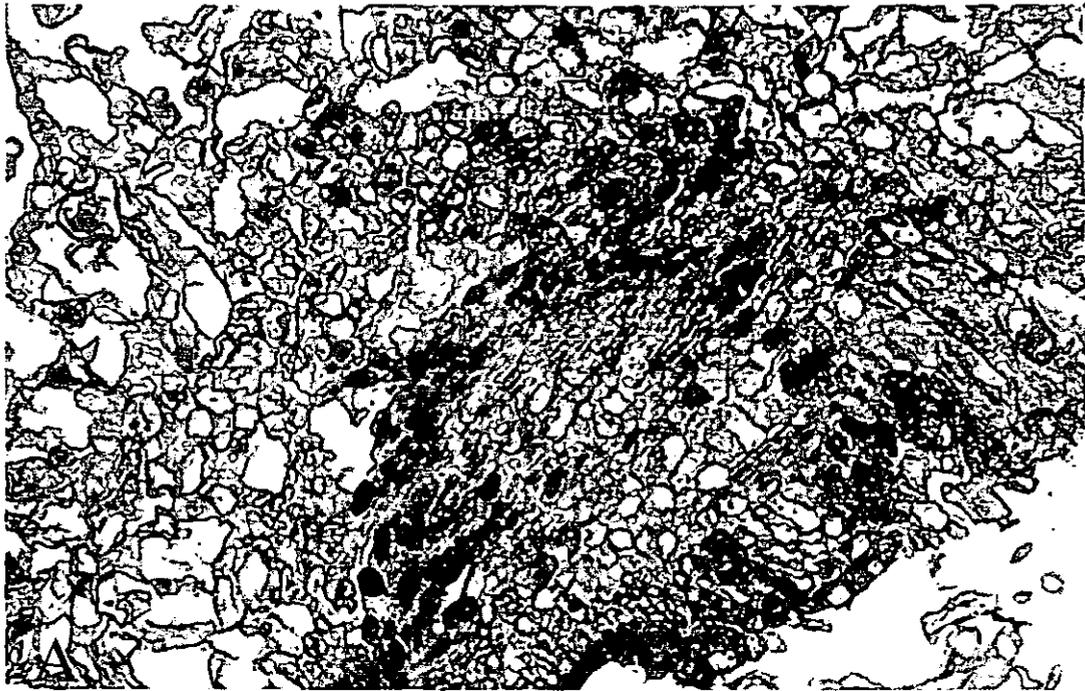
*15 semanas de cultivo:* Además de las características descritas con anterioridad, también se identificaron células con cristales poligonales que se caracterizaron por ser refringentes. El explante del ápice es una porción de tejido meristemático y probablemente por el hecho de que se encontraban en continua división mitótica, se retardó la diferenciación y la aparición de células con taninos en los cultivos celulares. Diferentes autores mencionan la importancia del estado fisiológico y la edad del explante utilizado ya que este juega un papel importante en la determinación de la respuesta en el cultivo *in vitro*. Por lo tanto la tendencia es el empleo de tejidos más indiferenciados y los más jóvenes con crecimiento activo, dichas características han permitido obtener éxito en los cultivos *in vitro* (Gómez, 1998b; Álvarez, 1987).

*18 semanas de cultivo:* grupos de células que iniciaron su diferenciación, con ornamentaciones características de los elementos de conducción; y células con contenido fenólico en rojo (se tiñen de rojo por la presencia de taninos condensados). Los elementos traqueales se organizaron hacia el centro del callo y en la periferia, las células que acumularon en su interior taninos identificados por una coloración roja a café rojiza (safranina). Esta forma de organización de los elementos traqueales hacia el centro de la muestra ya se habían descrito anteriormente en cultivos de callos a partir de embriones.

*21 semanas de cultivo:* grupos de células que se dispusieron circularmente, con la apariencia de una dona, se distribuyeron en todo el callo.

Se observó una región de cambium la cual posteriormente dio origen al tejido vascular pero su organización no es típica, es decir presentan patrones extraños diferentes a la actividad típica del cambium vascular; a esto se le conoce como crecimiento anómalo. Además también se identificaron células parenquimáticas, células en división con núcleo y nucleolo; no se detectaron células con contenido fenólico.

En los callos que se formaron del ápice, a partir de la primera semana había material desdiferenciado aunque no es su totalidad, ya que durante la observación microscópica se detectaron zonas de tejido aun diferenciado. A partir de la sexta semana se observaron en su totalidad células parenquimáticas de distintos tipos, la diferenciación celular se inició a partir de la semana doce de cultivo y en la semana veintiuno se diferenciaron los elementos traqueales. Por otro lado, se identificaron células con material ergástico y taninos a partir de la primera semana de cultivo, quizá en menor cantidad que en los cultivos de tallo, raíz y hoja pero desde muy temprana edad estas células empiezan a producirse y organizarse.

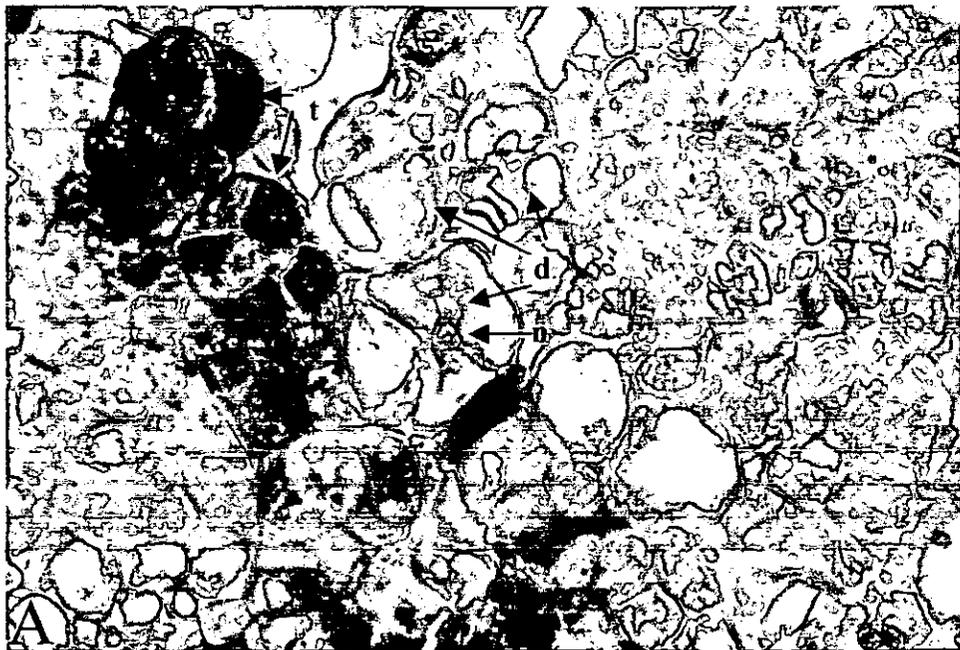
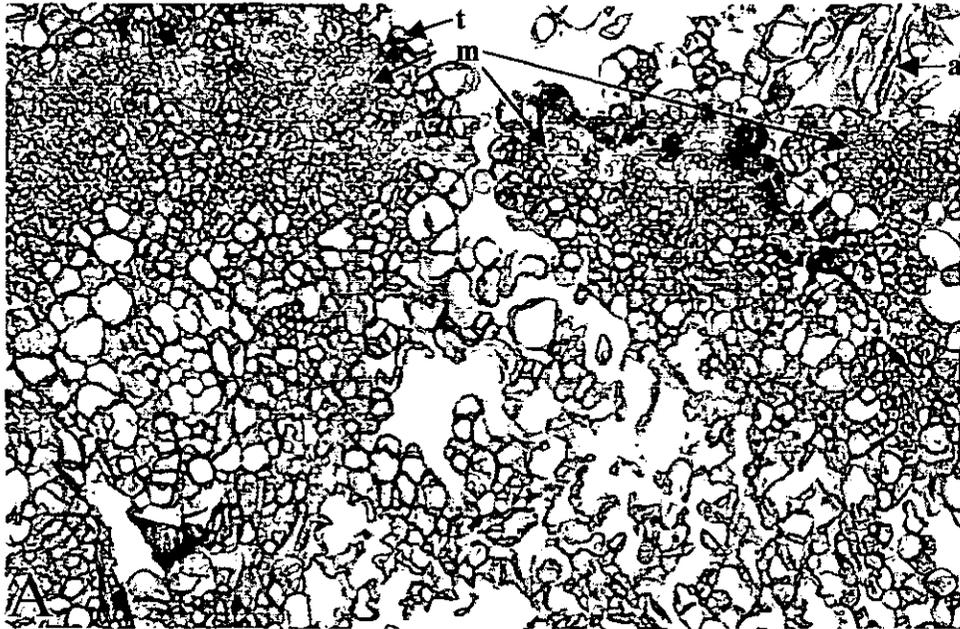


**Figura 10.** Microfotografías que muestran las características celulares de los callos obtenidos de explantes de ápice (3 semanas de cultivo).

A.- porción de tejido aún no desdiferenciado, se distingue la epidermis y células en empalizada

B y C.- tejido vascular

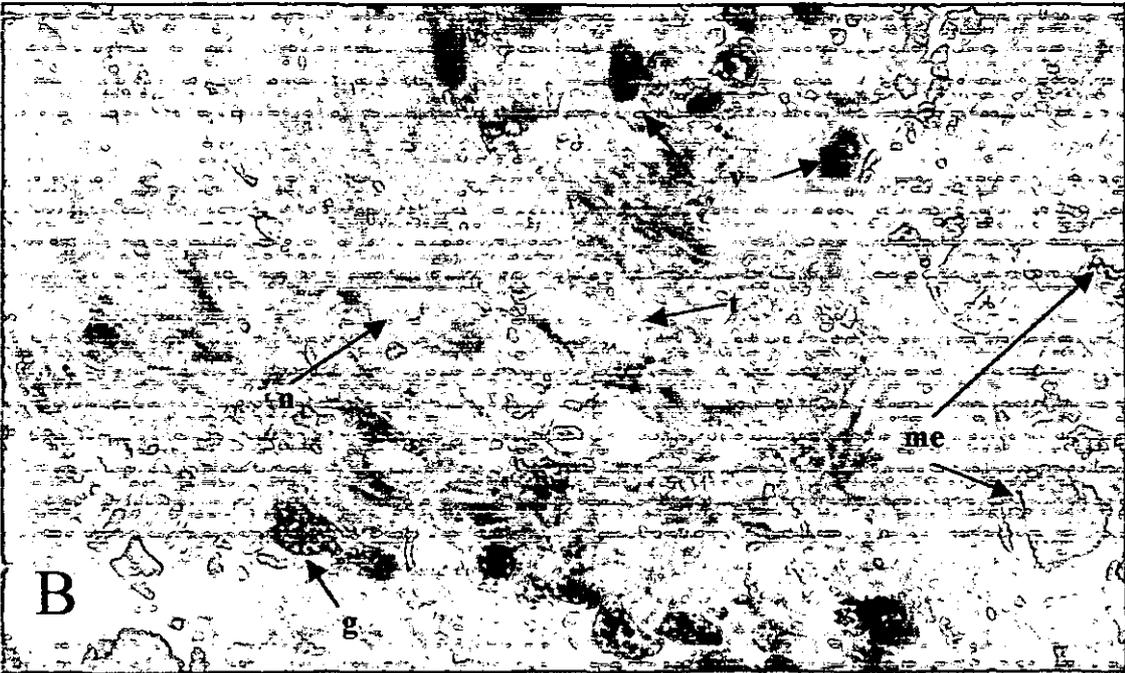
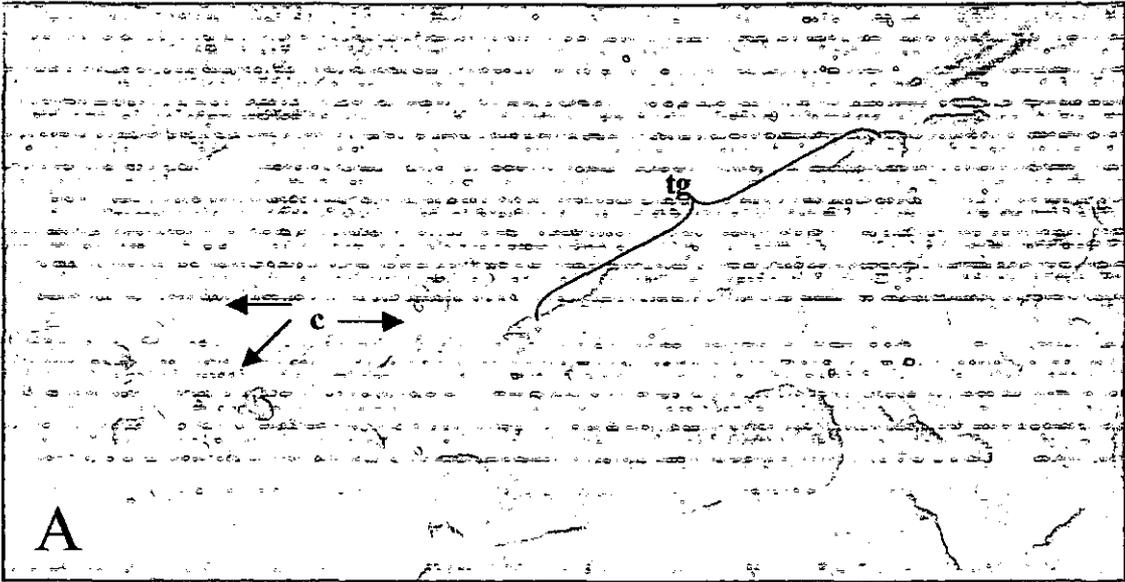
D.- células con contenido rojo (taninos condensados)



**Figura 11.** Microfotografías que muestran las características celulares del callo de ápice de 6 semanas de cultivo.

**A.-** en la parte superior de la microfotografía se observan abundantes zonas meristemáticas (m) y alrededor se encuentran las células con taninos (t); células alargadas, posiblemente restos del tejido de la plántula (a).

**B.-** células de gran tamaño en división celular (d) y núcleos evidentes (n)



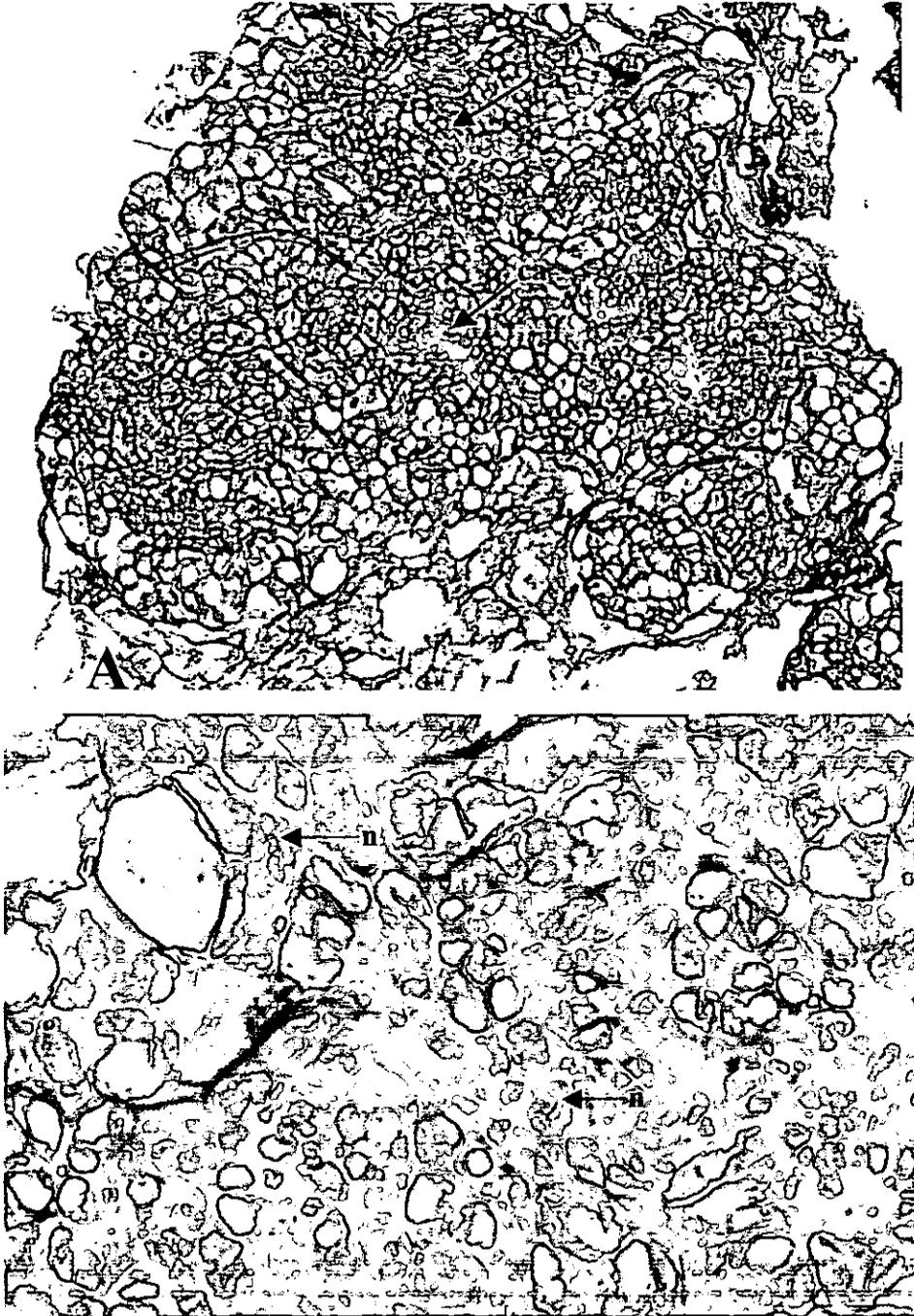
**Figura 12.** A.- callo-ápice, 9 semanas de cultivo. La microfotografía muestra la presencia de cristales de oxalato de calcio (c) y restos de un tricoma glandular (tg). B.- callo-ápice 12 semanas de cultivo, abundante material ergástico (me); taninos depositados en forma de gránulos en el citoplasma (g) y en la vacuola (v); células nucleadas (n) y elementos traqueales (t).



**FIGURA 13.** Microfotografías que ilustran el desarrollo vascular del callo-ápice (18 semanas de cultivo).

A.- crecimiento anómalo (ca).

B.- elementos traqueales (t) en diferentes planos, estos mismos elementos se unen entre si para formar un vaso(v); rodeando al tejido vascular se encuentran células parenquimáticas(p) y zonas meristemáticas(m).



**Figura 14.** Callo-ápice de 21 semanas de cultivo.

**A.-** Se observa que a partir de los 18-21 semanas de cultivo, se organizan zonas muy características. Es un tipo de cambium vascular atípico conocido como crecimiento secundario anómalo(ca).

**B.-** Células con núcleo y nucleolo (n).

## ii. Tallo.

*3 semanas de cultivo:* se observaron células polimorfas con núcleo evidente y vacuola que abarcaba gran parte del citoplasma. Algunas células de gran tamaño contenían algún tipo de material ergástico: almidón, oxalato de calcio o taninos, estos dos últimos muy abundantes. Este tipo de material estuvo presente desde la primera semana de cultivo (3 semanas).

*6 semanas de cultivo:* se observaron estructuras características del tallo: epidermis, parénquima compacto y porciones con formación de tejido de conducción pero con crecimiento secundario. Quizá las características estructurales de este tipo de explante le lleve más tiempo lograr la desdiferenciación en comparación con el ápice o los brotes.

*9 semanas de cultivo:* se identificaron tricomas glandulares con contenido de taninos (teñidas en color rojo). Células en diferentes etapas de división, con contenido que tiñe en color rojo: abundan células grandes con contenido granuloso, localizadas alrededor del tejido de conducción. La desdiferenciación fue asincrónica, iniciaba en la parte externa y posteriormente avanza hacia el interior del tejido. El lugar o sitio para el comienzo de la proliferación de los callos generalmente se localizó en la superficie del explante o en la superficie extirpada (Gómez, 1998).

*12 semanas de cultivo:* grupos de células muy unidas, son células polinucleadas en continua división y diferenciación celular. Se observaron células con una vacuola de gran tamaño teñidas en color rojo, el contenido ya se ha identificado anteriormente como taninos condensados, estas células se concentraron hacia la periferia. Las células cultivadas *in vitro* no mostraron la misma diversidad como en la citodiferenciación observada en plantas completas y frecuentemente sólo forman elementos vasculares (Cassab, 1981)

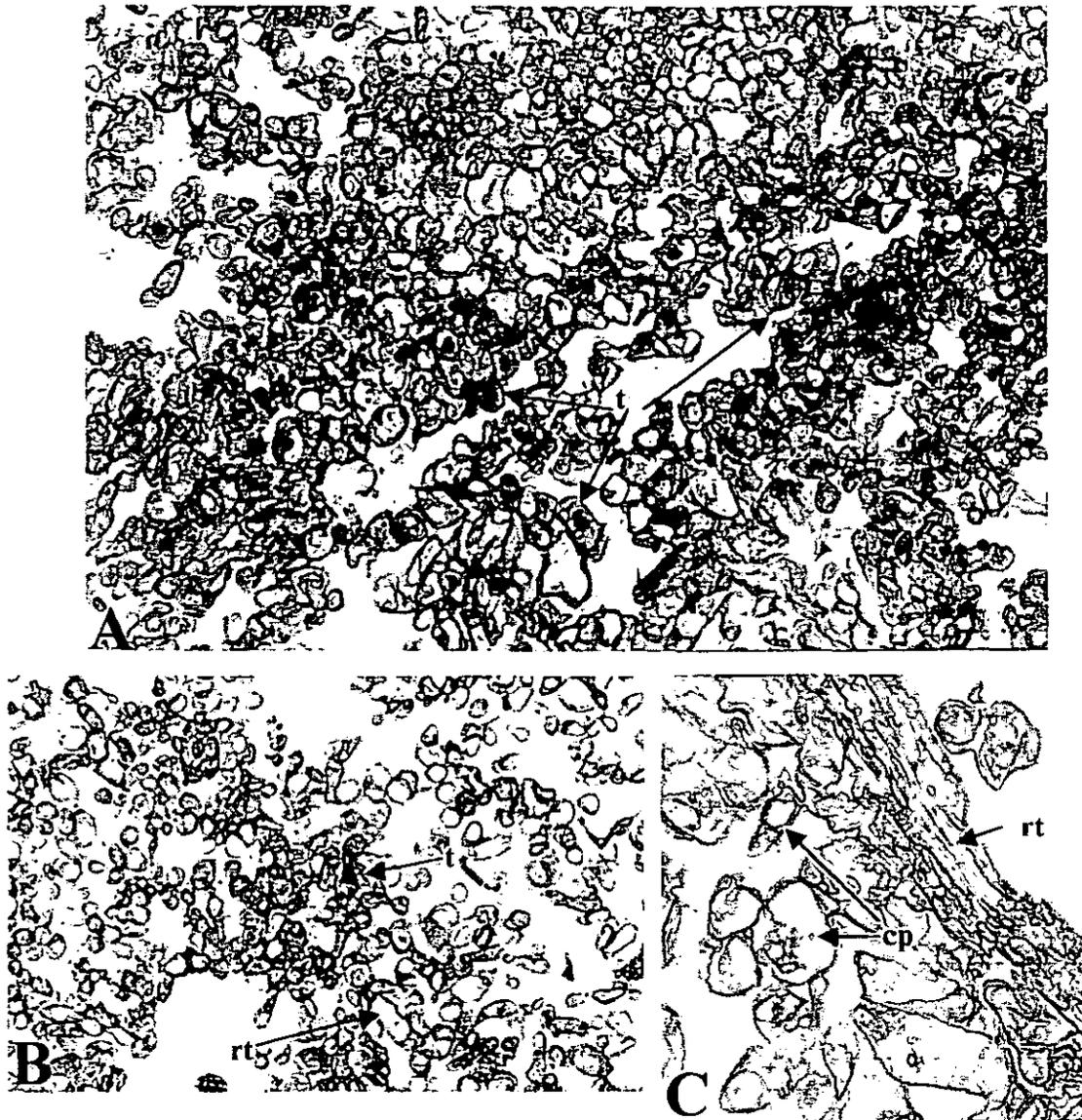
*15 semanas de cultivo:* células alargadas y con abundantes elementos traqueales. Se observó una evidente diferencia en los colores del contenido ergástico: células de contenido café y células que tiñeron en rojo debido a la naturaleza química de los metabolitos presentes. También se observaron dos formas en el depósito del material ergástico: un contenido en forma de gránulos en el citoplasma y un segundo, en el interior de la vacuola. Ambos tipos de depósito se encontraron presentes en los callos obtenidos de los diferentes explantes empleados.

*18 semanas de cultivo:* en la periferia se encontraron células menos diferenciadas y células con compuestos. Hacia el centro, el tejido de conducción estuvo organizado por grupos de elementos traqueales. En el tallo se encontró mayor número de células con taninos que en el ápice.

En general, en los callos se observó un mayor desarrollo de los haces vasculares al interior de la muestra, de esta manera había un transporte de los metabolitos requeridos para realizar todas las funciones necesarias para la sobrevivencia de las células localizadas al interior de la muestra.

*21 semanas:* en el centro de la masa celular se detectaron agrupaciones de células pequeñas en constante división mitótica, rodeada de células más grandes y elementos traqueales, es decir, a partir de una zona formada por tejido de conducción y parenquimático surgen centros meristemáticos.

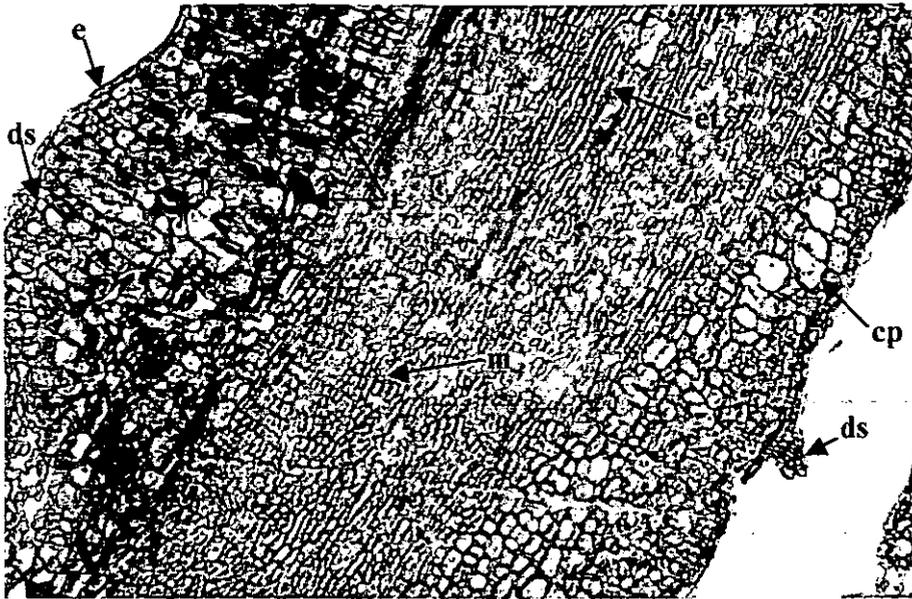
El tejido del tallo tardó en desdiferenciarse, aún en la semana nueve se observaba el tejido característico que constituye al tallo, quizá esto se deba a las características del tejido que lo compone haciendo más difícil la obtención de callos. En la semana 12 se observaron grupos de células muy compactas, pero ya con formación de elementos traqueales. Estos mismos elementos se diferenciaron por organizarse en grupos.



**Figura 15.** Microfotografía que muestra las principales características del callo-tallo de 3 semanas de cultivo.

A. - células parenquimáticas (cp), la mayoría de ellas contienen taninos y se identifican por su coloración roja (t).

B y C. - restos de tejido diferenciado originario del explante donador (rt).

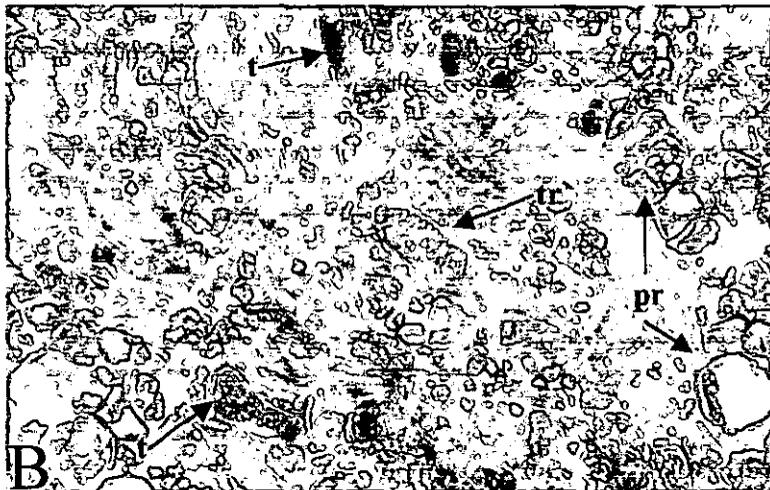
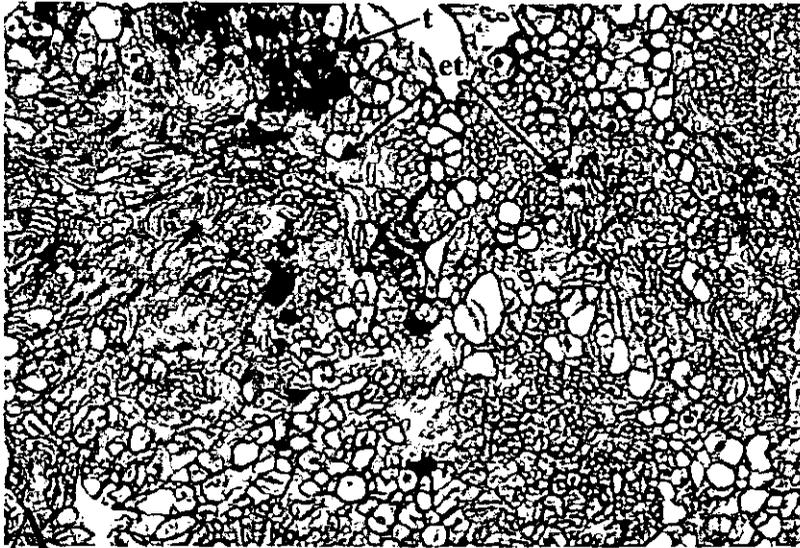


**B**

**Figura 16.** Cortes histológicos correspondientes a los cultivos celulares de tallo.

**A.-** callo de 6 semanas de cultivo. El callo aún no se ha logrado desdiferenciar en su totalidad observándose tejido característico de tallo: epidermis(e), células parenquimáticas(cp), parenquima con contenido fenólico (taninos) (t) y restos del haz vascular(et). En el centro de la muestra se distingue un area en división celular(m), los núcleos son evidentes. En los extremos de la muestra se observa porciones de células que han iniciado su desdiferenciación(ds).

**B.-** callo de 9 semanas de cultivo: crecimiento secundario(cs) y células con material ergástico que se tiñeron en color morado(me), esta diferencia quizá se deba a la naturaleza química del compuesto almacenado en las células.



**Figura 17.** Cortes histológicos del callo-tallo de 12 semanas de cultivo.

**A.-** los callos provenientes de los explantes de tallo y de 12 semanas de cultivo presentan abundantes elementos traqueales(et) completamente formados alrededor de estos elementos se encuentran las células con taninos(t).

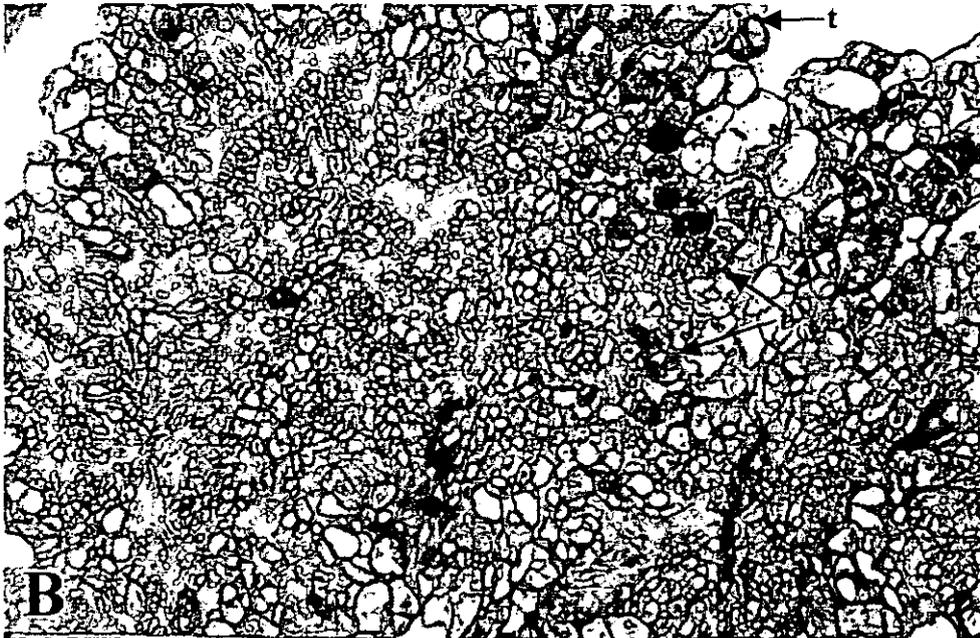
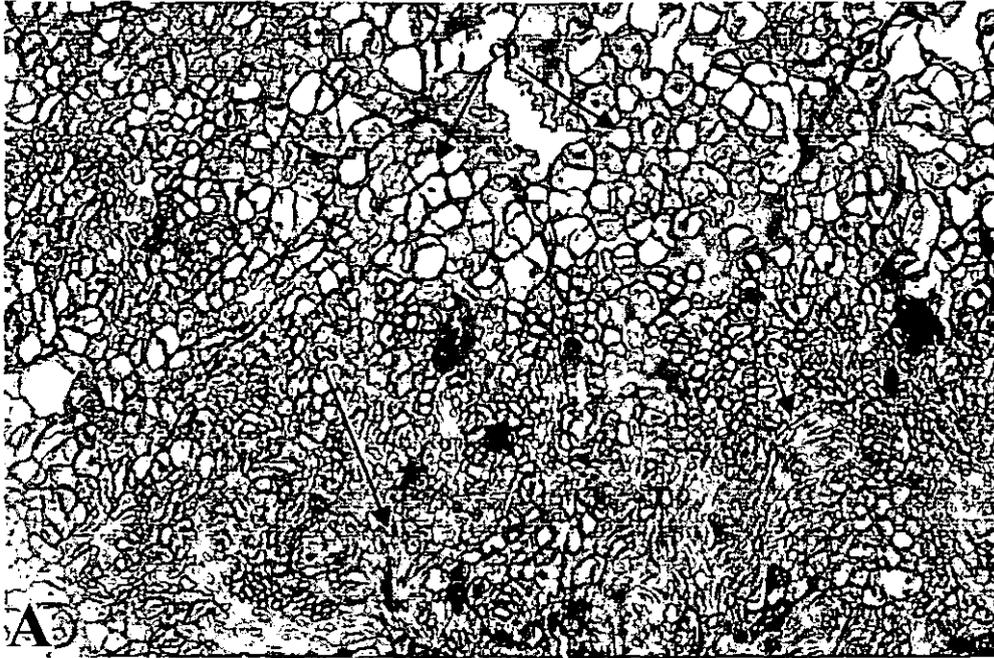
**B.-** elementos traqueles con ornamentación reticular (tr), células parenquimáticas de reserva(pr) y de contenido fenólico(t).



**Figura 18.** Serie de microfotografías que ilustran el contenido celular de taninos y la forma de depositación de estos compuestos.

**A.-** almacenamiento de los taninos en forma de gránulos(g).

**B y C.-** depositación de taninos en la vacuola(v).



**Figura 19.** Características anatómicas del callo-tallo de 18 semanas de cultivo.

A.- la parte central de la muestra se caracteriza por la presencia de elementos traqueales y de crecimiento secundario(cs), alrededor de esta área se encuentran células parenquimáticas (cp) las cuales pueden dar origen a centro meristemáticos.

B.- células de gran tamaño con contenido fenólico(t) localizadas generalmente alrededor del crecimiento secundario.



**Figura 20.** Características anatómicas del callo-tallo de 21 semanas de cultivo. Células nucleadas(n), elementos traqueales cortados transversalmente(et) y células parenquimáticas con contenido en taninos(t) y otro tipo dematerial ergástico(me).

### iii. Raíz.

*12 semanas de cultivo:* se observó un gran número de células pequeñas en división y diferenciación celular. Las células empezaron a organizar un haz vascular que al microscopio se veían en forma de dona, el haz vascular no estaba bien definido (crecimiento anómalo). Entre esos paquetes hay células de parénquima con núcleos muy evidentes de las que probablemente se originan las regiones meristemáticas, es decir, que las células que estaban en continua división se diferenciaron a tejido vascular o surgían células parenquimáticas que al mismo tiempo iniciaban su división celular. Por otra parte también se identificaron células parenquimáticas de gran tamaño que se estaban dividiendo. De acuerdo a observaciones histológicas se localizaron regiones en el callo en las que, el tejido vascular estaba rodeado de células parenquimáticas, mismas que dieron origen a centros meristemáticos.

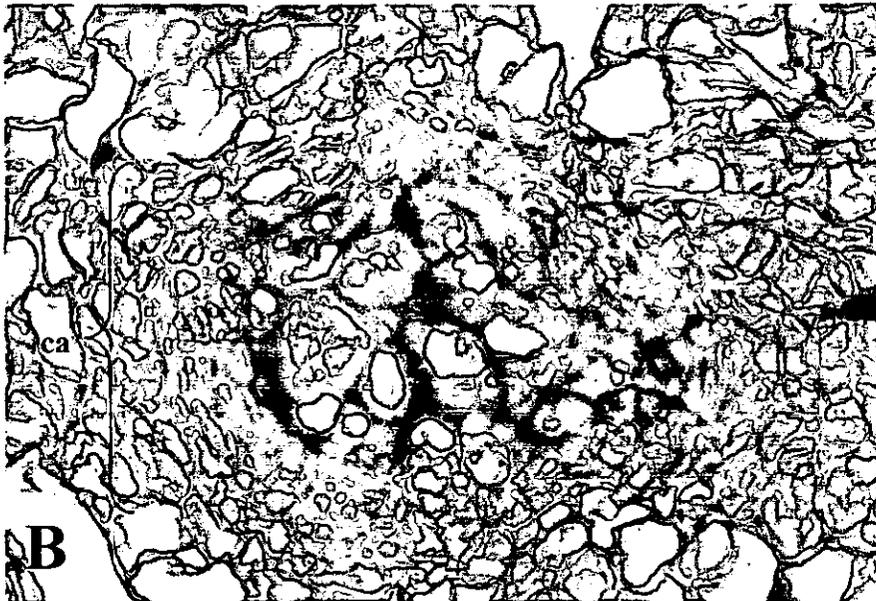
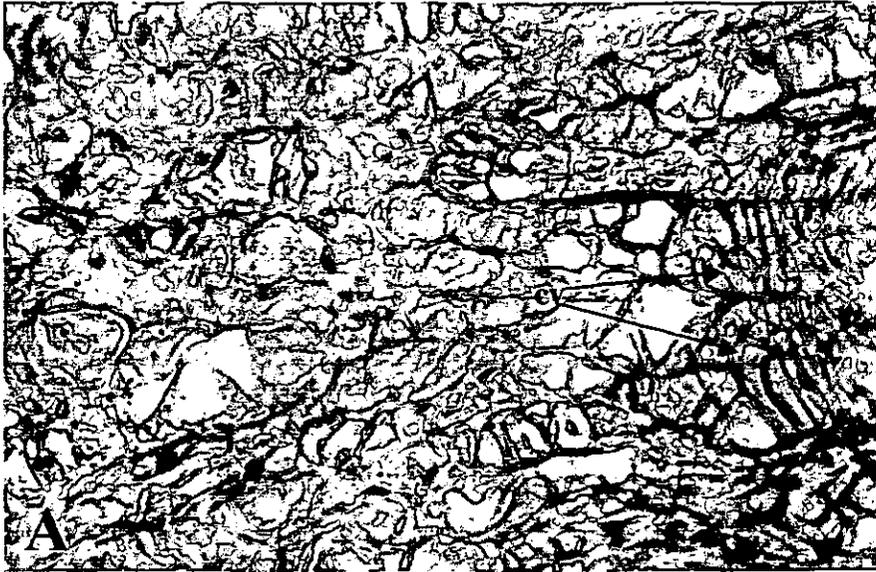
*15 semanas de cultivo:* células en división celular y con núcleo evidente; grupos de células y elementos traqueales completamente diferenciados, semejante a un corte de raíz. Además células muy compactas con material fenólico teñido de rojo y células grandes colapsadas, sin embargo, poseían un núcleo bien definido. En otros estudios anatómicos de células de callo se había observado las mismas características: células grandes de tipo parenquimático colapsadas y sin ningún patrón de organización (Gómez, 1998b).

*18 semanas de cultivo:* se detectó la diferenciación de elementos traqueales, células con material granuloso teñido de rojo. Las células conductoras poseían ornamentaciones que no se colorearon de rojo, por lo tanto poseen paredes primarias. Se observaron cristales dentro de la célula, otros estudios histoquímicos realizados en esta especie medicinal muestra que los cristales generalmente son de oxalato de calcio.

21 semanas: el callo estaba rodeado de células con taninos y al centro, células diferenciándose. Se distinguen células de cambium vascular alrededor del xilema. Las células que se ven alargadas serán las futuras porciones del xilema.

El callo proveniente de la raíz, tardó en desdiferenciarse. Morfológicamente se observó que en la parte más superficial del explante se producen pequeños brotes de callo, fue entonces a partir de la semana 12 que se logró obtener una pequeña muestra de callo, en los estudios anatómicos se identificó crecimiento anómalo y cambium vascular.

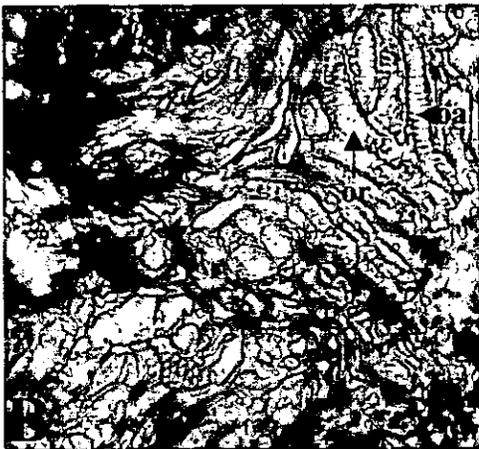
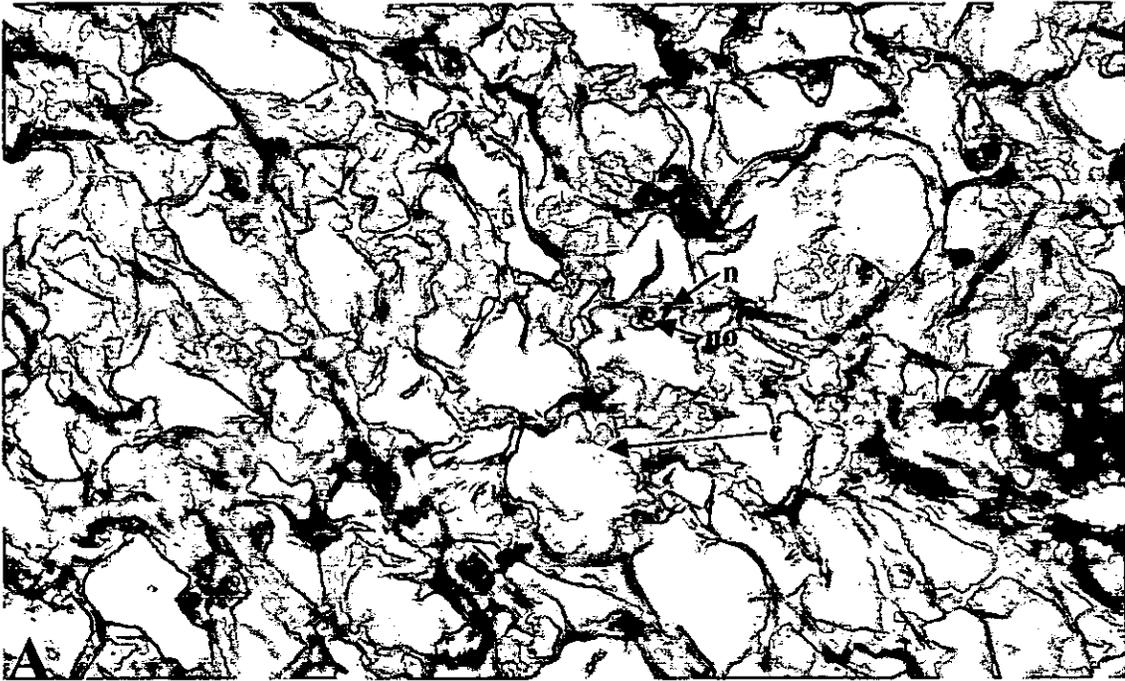
Lo que se ha observado en los diferentes materiales obtenidos (callo) es que cada tipo de callo posee características estructuras diferentes dependiendo del explante utilizado, de esta forma, la raíz tiene la función de absorber agua y sustancias disueltas en la misma, así como la fijación de la planta al suelo y esto lo realizan por medio del tejido vascular, que está constituido de tejido especializado para el transporte, quizá sean estas características estructurales las que influyan en el desarrollo y formación estructural del callo, es decir se caracterizó por la formación abundante de tejido vascular.



**Figura 21.** Microfotografías que muestran el desarrollo vascular de los callos obtenidos de explantes de raíz de 12 semanas de cultivo.

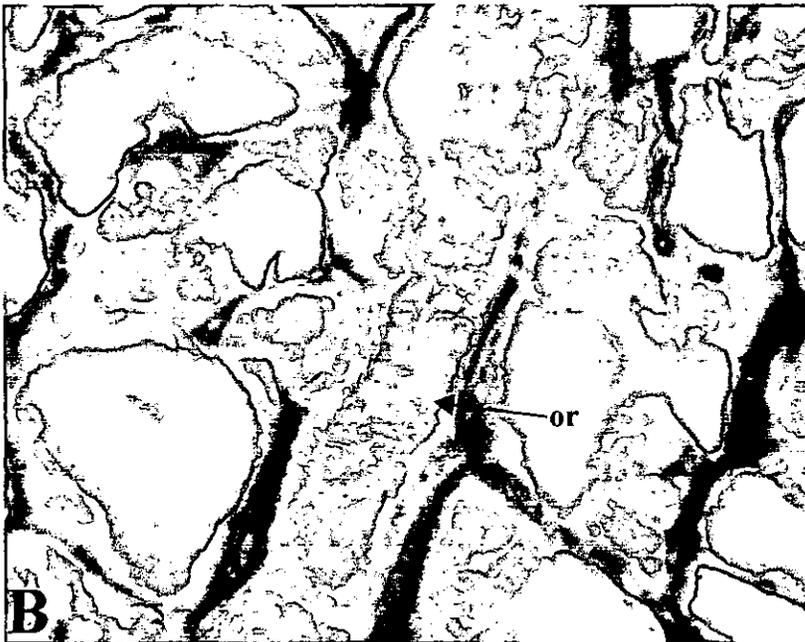
**A.-** cambium vascular(cv).

**B.-** crecimiento anómalo(ca).



**Figura 22.** Características anatómicas del callo-raíz de 15 semanas de cultivo.

- A.- células colapsadas(c) con núcleo(n) y nucleolo(no) evidente.
- B.- elementos traqueales completamente desarrollados, los cuales se distinguen por su ornamentación reticular(or) y anular(oa).



**Figura 23.** Microfotografías que ilustran las características anatómicas de callo-raíz de 18 semanas de cultivo.

A.-parenquima de reserva(pr).

B.- elemento traqueal que se distingue por su ornamentación reticular (or).



**Figura 24.** Organización celular del callo-raíz de 21 semanas de cultivo.

**A.-** los elementos traqueales(et) y el crecimiento secundario(cs) se localizan al centro de la muestra, alrededor de esta área se localizan dos tipos de células: parenquimáticas de gran tamaño(cp) y células con contenido de taninos (t).

**B.-** elementos traqueales(et) en diferentes planos y crecimiento secundario (cs).

#### iv. Hoja.

*12 semanas de cultivo:* células en continua división y diferenciación celular, es decir, formación de gran cantidad de haces vasculares; sus ornamentaciones se distinguen pues se tiñen de color rojo, se observan haces cortados en distintos planos. Nuevamente las células con contenido rojo, tienden a ubicarse en la periferia.

*15 semanas de cultivo:* en esta etapa, las células empiezan a diferenciarse, es decir se organizaron en forma de paquetes y se encuentran localizadas principalmente en el centro de la muestra. Células de gran tamaño con núcleos muy grandes y nucleolos. Otras se están dividiendo, proceso que se observa en diferentes planos. Células con taninos a la periferia del callo.

*18 semanas:* grupos de células hacia la periferia con contenido rojo. Se observó gran número de células que se están dividiendo. En la periferia se identificó un proembrión. Se distinguen células con granos de almidón. Hay zonas específicas en donde hay más diferenciación de células conductoras e incluso se ven las ornamentaciones cortadas transversal y longitudinalmente.

*21 semanas:* se observó mayor cantidad de material teñido de rojo y de material diferenciado. Muy notorio el color rojo en todas partes, muy pocas zonas verdes, abundantes zonas meristemáticas.

Solo a partir de la semana 12 se logro obtener una pequeña muestra de tejido, en donde se identificó una cantidad de haces vasculares bien diferenciados, rodeados de células con material ergástico, esta es una característica típica de las células superiores, es decir su haz vascular que está rodeado por células con taninos como un sistema de protección. En estas mismas muestras se identificó gran cantidad de almidón. El tejido que compone a la hoja se caracteriza por poseer células con diferente material ergástico entre ellas almidón y taninos, de acuerdo a investigaciones

fitoquímicas refieren que la corteza presenta saponinas triterpenoides y una gran cantidad de taninos condensados. (Camargo-Ricalde, 1996) El material ergástico en los callos después de varias semanas de subcultivo, en la semana 21 se identifico gran cantidad de material ergástico.

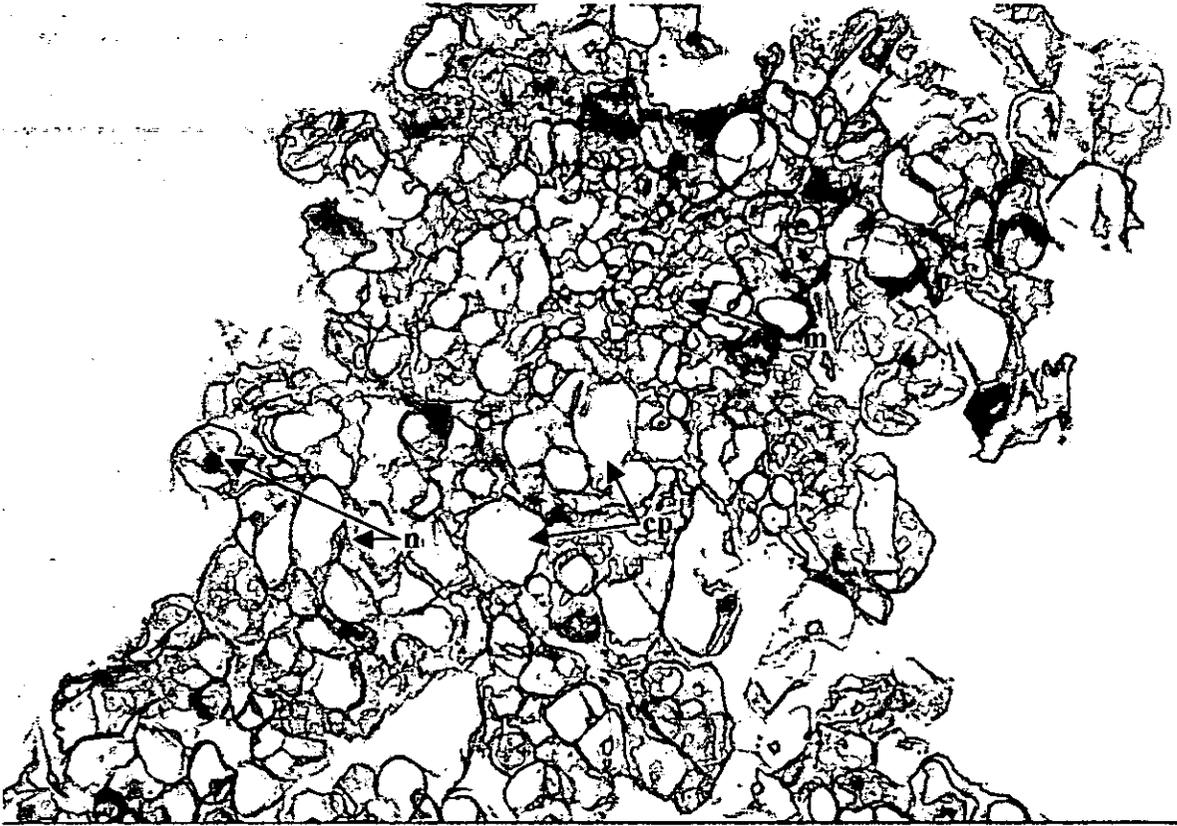


**Figura 25.** Características anatómicas del callo-hoja de 12 semanas de cultivo.

**A.** - crecimiento anómalo(ca), cambium vascular(cv) y taninos(t)

**B.** - elementos traqueales(et) y taninos(t)

**C.** - cambium vascular(cv), núcleo(n), nucleolo(no) y elementos traqueales(et).



**Figura 26.** Callo originado a partir de explante de hoja de 15 semanas de cultivo. En el centro de la muestra se identifica un grupo de células pequeñas, posiblemente una zona meristemática(m), la cual está rodeada por células parenquimática(cp) de mayor tamaño, con núcleos(n) grandes y densos.



**Figura 27.** Serie de microfotografías que ilustran las principales características del callo-hoja de 18 semanas de cultivo.

**A.-** cambium vascular(cv).

**B.-** parenquima de reserva(pr).

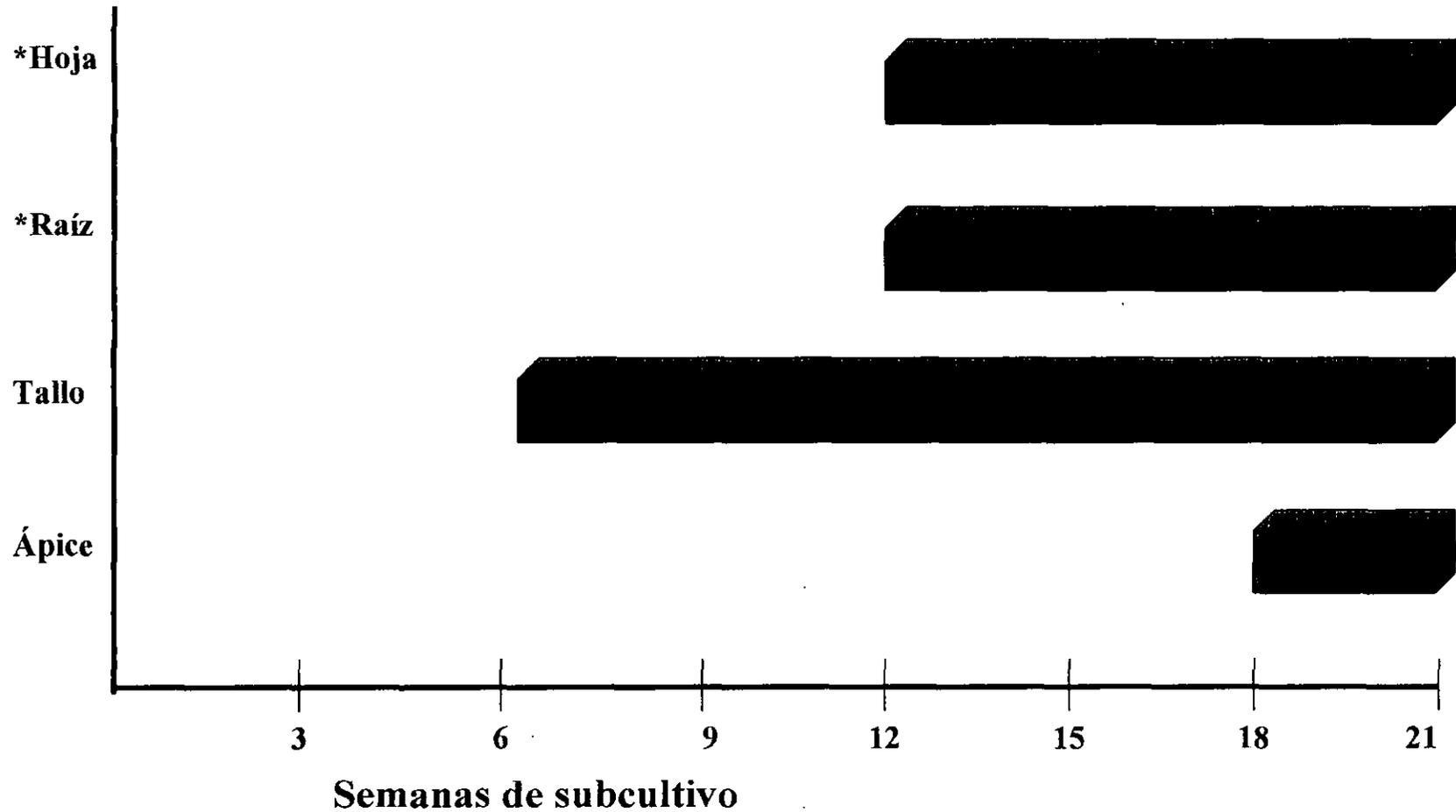
**C.-** células parenquimáticas con núcleo(n) y nucleolo(no); presencia de taninos(t).



**Figura 28.** Microfotografía del callo-hoja de 21 semana de cultivo. Se observa crecimiento secundario(cs) y alrededor del mismo se identifican células con taninos(t) y células parenquimáticas nucleadas(cp). El corte histológico es similar a un corte radial de tallo.

## Crecimiento anómalo en cultivos celulares de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret

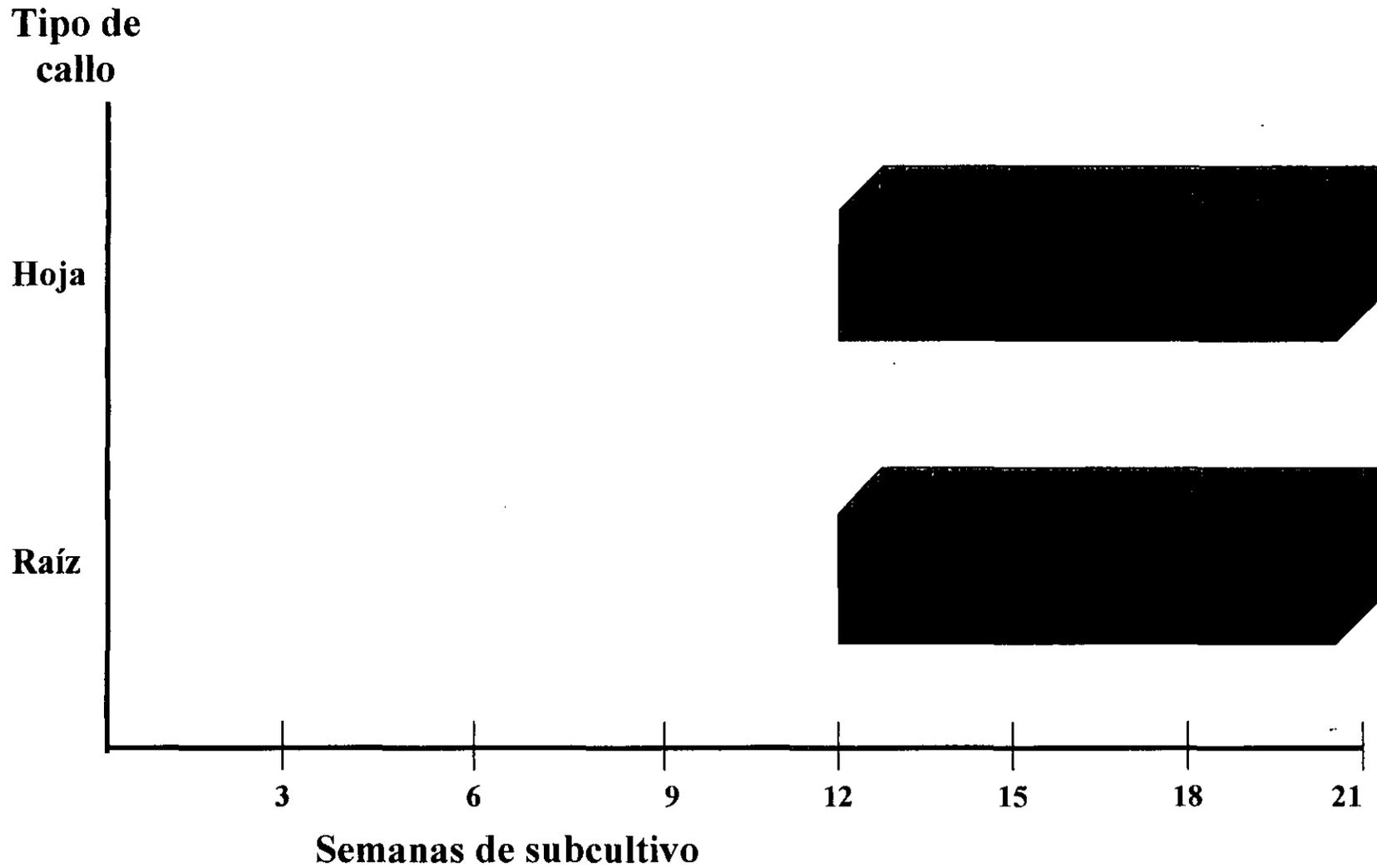
Tipo de callo



**Gráfica 1.** Representación del crecimiento anómalo con relación al tiempo de subcultivo y tipo de callo originado.

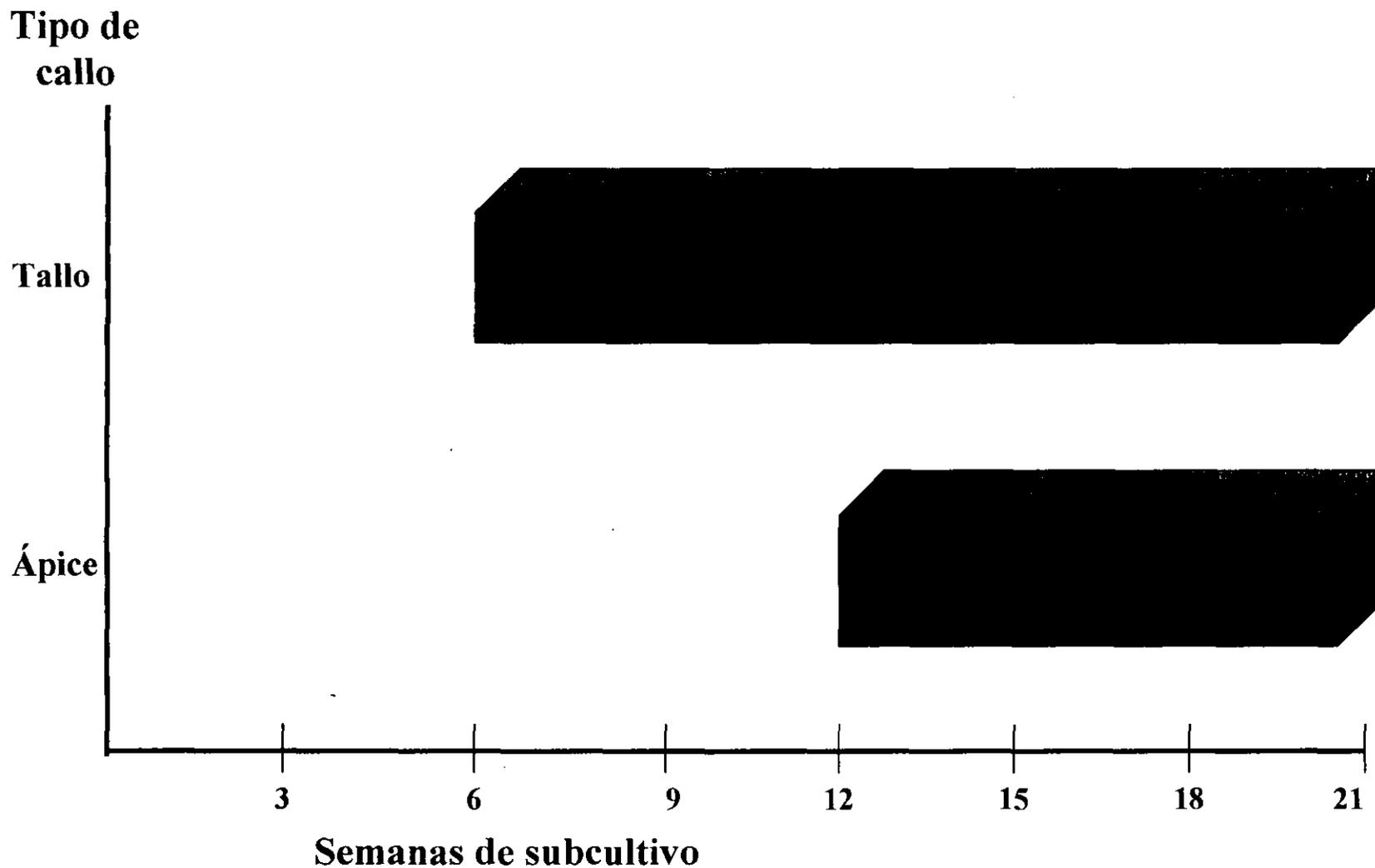
- el callo se originó a partir de la semana doce.

# Desarrollo del haz vascular en cultivos celulares de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret



**Gráfica 2.** El desarrollo del haz vascular y cambium anómalo se observó a partir de las primeras semanas de cultivos (semana doce).

# Desarrollo del haz vascular en cultivos celulares de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret



**Gráfica 3.** En los callos obtenidos a partir de explantes de tallo se observó un desarrollo temprano del tejido vascular y cambium anómalo. Los callos obtenidos a partir de explantes de ápice se diferenciaron porque la diferenciación de haces vasculares se desarrolló en la semana doce.

*c. Histoquímica de los cultivos celulares.*

Las pruebas histoquímicas permitieron la evaluación cualitativa que complemento al estudio cromatográfico de las saponinas, taninos, alcaloides, lignina y almidón.

Dentro del grupo de las saponinas se han identificado los mimonósidos A, B y C, estos compuestos son los responsables de la proliferación celular. El grupo químico de los alcaloides posee efectos sobre el Sistema Nervioso Central y se le adjudica acción anestésica local, se ha identificado la N,N, dimetilriptamina (DMT). La lignina es un compuesto polifenólico que se deposita durante el proceso de diferenciación de las esclereidas, se caracterizan por ser células muertas y su papel el de conducción y sostén. La prueba de floroglucina-HCL permitió identificar el tipo de callo que presentaba mayor diferenciación. Cabe recordar que uno de los objetivos fue el de lograr un callo con el mínimo grado de diferenciación y constituido principalmente de células parenquimatosas. Además de este grupo de compuestos se determinó otro tipo de material ergástico como es el almidón y taninos. De acuerdo a observaciones microscópicas, Camargo-Ricalde, (1996) refiere que "la corteza presenta una gran abundancia de fibras, de cristales de oxalato de calcio y abundante almidón".

**Observaciones generales:**

El análisis histoquímico de saponinas, taninos y alcaloides indicó que la acumulación de estos compuestos se observó en dos formas:

1. A nivel celular, en las vacuolas, pared celular y tricomas.

2. En las secciones histológicas, el material ergástico se localizó en las células parenquimáticas de la periferia y en el parénquima del haz vascular.

En la plántula, los compuestos se identificaron principalmente en epidermis, en las células parenquimáticas del haz vascular y en el parénquima de reserva.

**i. Saponinas y taninos:** se identificaron por una coloración amarilla, en tanto que, los taninos por una coloración café rojiza. La acumulación se localizó principalmente en la pared (taninos) y en las vacuolas (taninos y saponinas).

**Observaciones específicas del callo-ápice:** a partir de la semana 12, se observó la depositación de saponinas, la presencia de este material fue escasa observándose en células aisladas o en grupos pequeños de células. La presencia de taninos era importante.

<b>Ex p l a n t e : A P I C E</b>								
<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>T I E M P O D E S U B C U L T I V O : s e m a n a N o .</b>							
	<b>Plántula</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>21</b>
<b>Saponinas</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Taninos</b>	+	+	+	+	+	+	+	+



Reacción positiva



Abundante depositación de material ergástico



Escasa depositación de material ergástico

**Observaciones específicas del callo-tallo:** la reacción fue muy evidente al agregar el ácido sulfúrico, se observó inmediatamente la coloración. La distribución de células con contenido en taninos se observó principalmente las células parenquimáticas del haz vascular y alrededor de las células que se diferenciaban. Durante la semana 18 y 21, se caracterizo por un abundante contenido de células que almacenaban taninos, siendo notable en la periferia de las secciones y en el haz vascular.

<b>Ex plante: T A L L O</b>								
<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>T IEMPO DE SUBCULTIVO: semana No.</b>							
	<b>Plántula</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>21</b>
<b>Saponinas</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Taninos</b>	+	+	+	+	+	+	+	+



Reacción positiva



Abundante depositación de material ergástico



Escasa depositación de material ergástico

**Observaciones específicas del callo-raíz:** a partir de la semana 21 se observó un gran contenido taninos, siendo menos evidente el contenido en saponinas.

<b>Ex p l a n t e : R A Í Z</b>					
<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>T I E M P O D E S U B C U L T I V O : s e m a n a N o .</b>				
	<b>Plántula</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>21</b>
Saponinas	+	+	+	+	+
Taninos	+	+	+	+	+



Reacción positiva



Abundante depositación de material ergástico



Escasa depositación de material ergástico

**Observaciones específicas del callo-hoja:** la presencia de material ergástico (saponinas y taninos) fue escasa sobretodo en callos de mayor tiempo de subcultivo.

<b>Ex p l a n t e : H O J A</b>					
<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>T I E M P O D E S U B C U L T I V O : s e m a n a N o .</b>				
	<b>Plántula</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>21</b>
<b>Saponinas</b>	+	+	+	+	+
<b>Taninos</b>	+	+	+	+	+



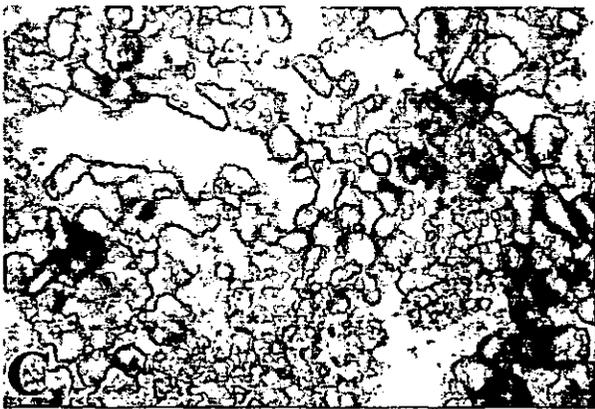
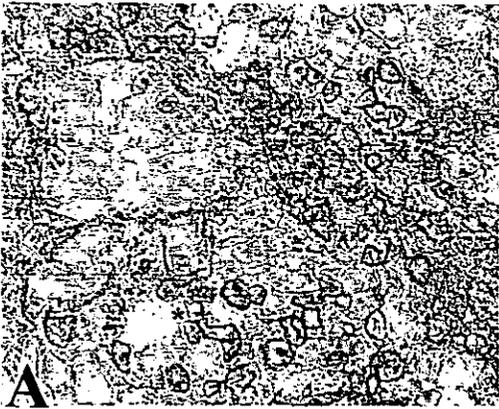
Reacción positiva



Abundante depositación de material ergástico



Escasa depositación de material ergástico

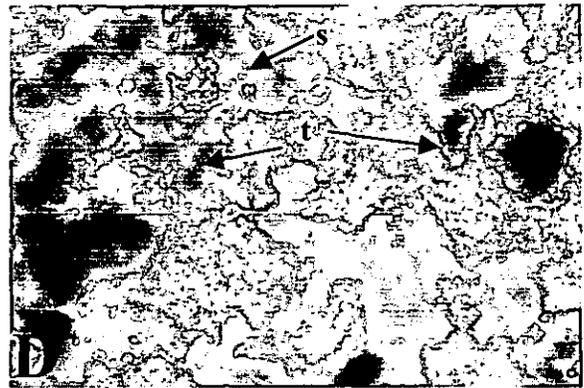
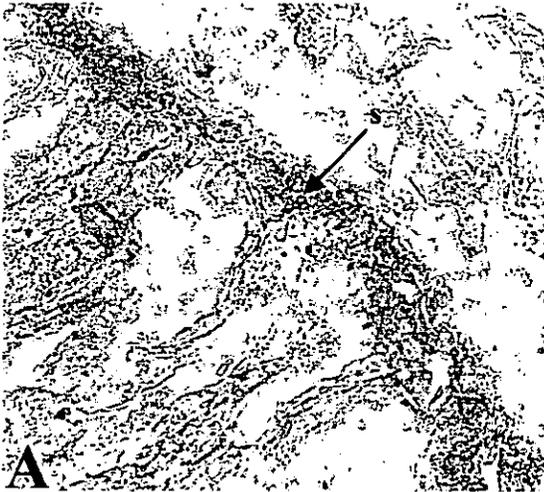


**Figura 29.** Serie de microfotografías que muestran la distribución de saponinas(\*) y taninos(♣) en los diferentes explantes utilizados para los cultivos vegetales.

- A.- la presencia de saponinas en el ápice se caracterizó por una coloración amarilla. Corte longitudinal-tangencial.
- B.- saponinas en el parénquima del tallo. Corte longitudinal-tangencial.

**C y D.** se distinguen tres formas de depositación de los compuestos: saponinas localizadas en vacuolas pequeñas de forma circular y en las células adyacentes de los estomas (color amarillo); taninos almacenados en vacuolas grandes (color café). Corte axial de la hoja.

**E.-** las saponinas se encuentran distribuidas en las vacuolas del parénquima fundamental. Corte longitudinal-tangencial.



Ápice 6s saponinas

Hoja 12s saponinas

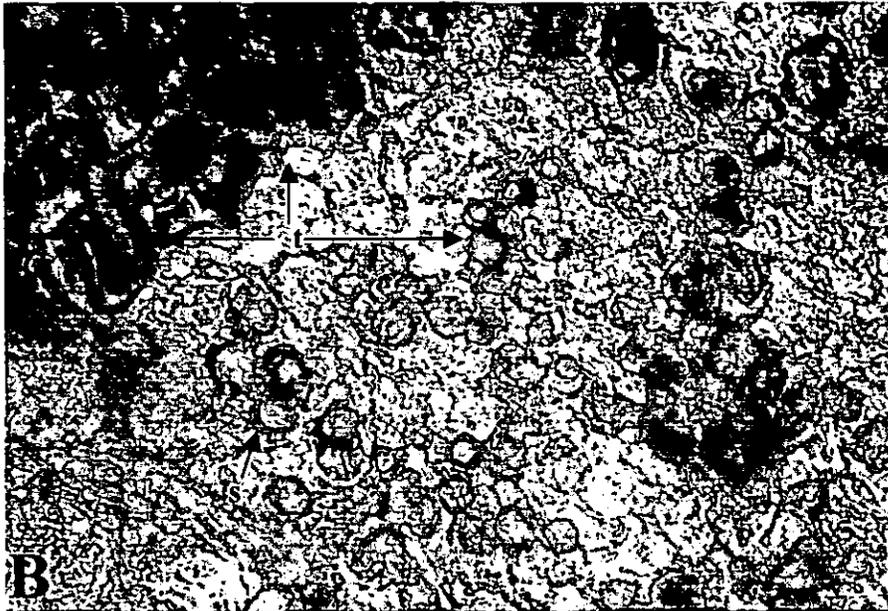
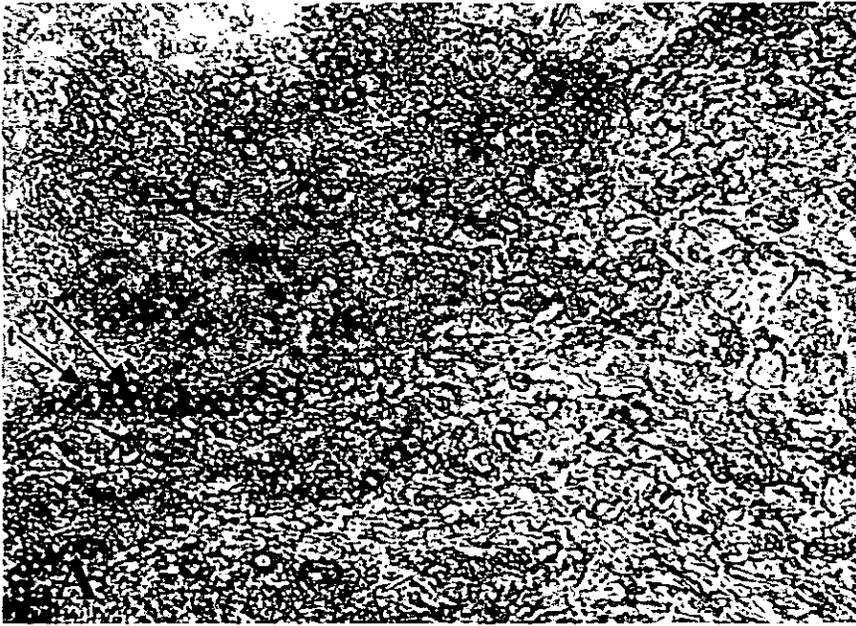
**Figura 30.** La localización de los compuestos bioactivos en los cultivos celulares se caracterizó por distribuirse en una forma particular, principalmente en la periferia del callo, y en las células parenquimatosas que rodean a los elementos de traqueales. A nivel celular se concentraban en la vacuola, en el citoplasma (en forma de gránulos) y en la pared celular.

**A.-** el callo-ápice de cuatro semanas de cultivo se identificó la presencia de saponinas(s) en la epidermis. Esta característica se observó en los callos de las primeras semanas de cultivo que aún conservaban ciertas características tisulares del explante. Callo-ápice, 4 semanas de cultivo.

**B.-** distribución de saponinas(s) y taninos(t) en la periferia de la muestra. Callo-tallo, 3 semanas de cultivo.

**C.-** depositación de las saponinas(s) y taninos(t). en la vacuola, el citoplasma en forma de gránulos y la pared celular(s/t). Callo-ápice, 6 semanas de cultivo.

**D.-** presencia de taninos(t) y saponinas(s). Callo-hoja, 12 semanas del cultivo.



**Figura 31.** Presencia de taninos y saponinas en los cultivos de callo-tallo.

**A.** - taninos y saponinas localizados en la periferia de la muestra.

**B.** - acercamiento de la imagen anterior, en donde se distingue una depositación en vacuolas pequeñas y redondas (taninos y saponinas) y otra en vacuolas grandes (taninos).

**ii. Alcaloides:** se diferenciaron por su coloración café oscuro.

**Observaciones específicas del callo-ápice:** en general, la reacción fue muy escasa, presentándose en células individuales del haz vascular.

En la plántula, la presencia de células con contenido en alcaloides fue también muy escasa.

<b>Ex p l a n t e : A P I C E</b>								
<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>T I E M P O D E S U B C U L T I V O : s e m a n a N o .</b>							
	<b>Plántula</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>21</b>
<b>Alcaloides</b>	+	+	+	+	+	+	+	+



Reacción positiva



Abundante depositación de material ergástico



Escasa depositación de material ergástico

**Observaciones específicas del callo-tallo:** únicamente a partir de la semana 21 se observo abundante material distribuido en toda la muestra. También se observaron tricomas con reacción positiva.

<b>Ex p l a n t e : T A L L O</b>								
<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>T I E M P O D E S U B C U L T I V O : s e m a n a N o .</b>							
	<b>Plántula</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>21</b>
<b>Alcaloides</b>								



Reacción positiva



Abundante depositación de material ergástico



Escasa depositación de material ergástico

**Observaciones específicas del callo-raíz:** en el período comprendido entre la semana 18 y 21 de subcultivo se identificó un solo grupo de células teñidas en café oscuro; distribuidas al exterior de la muestra.

En la plántula, el material ergástico se localizó en la epidermis y a nivel celular en la vacuola.

<b>Ex p l a n t e : R A Í Z</b>					
<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>T I E M P O D E S U B C U L T I V O : s e m a n a N o .</b>				
	<b>Plántula</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>21</b>
<b>Alcaloides</b>	+	+	+	+	+



Reacción positiva



Abundante depositación de material ergástico



Escasa depositación de material ergástico

**Observaciones específicas del callo-hoja:** la reacción fue evidente a partir de la semana 18.

<b>Ex p l a n t e : H O J A</b>					
<b>Compuesto bioactivo</b>	<b>T I E M P O D E S U B C U L T I V O : s e m a n a N o .</b>				
	<b>Plántula</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>21</b>
<b>Alcaloides</b>	+	+	+	+	+



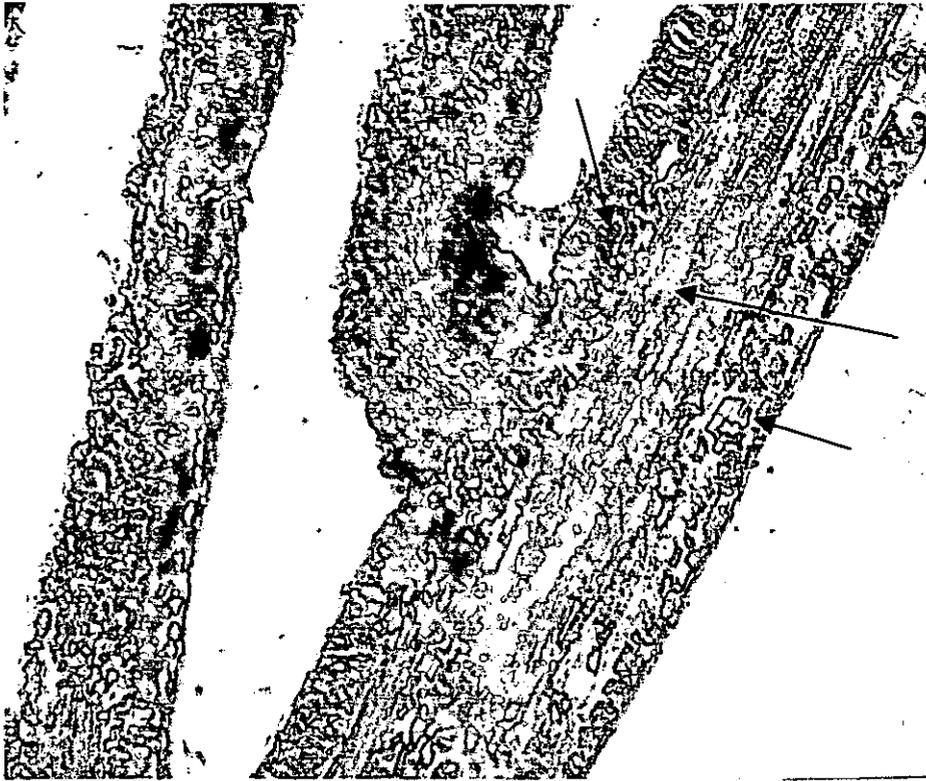
Reacción positiva



Abundante depositación de material ergástico



Escasa depositación de material ergástico



**Figura 32.** La distribución de los alcaloides en la plántula de *M. tenuiflora* se localizó principalmente en la epidermis y en las células parenquimáticas que rodean los elementos traqueales. La reacción se caracterizó por un color café-rojizo( →). Corte longitudinal-tangencial.



**Figura 33.** Identificación de alcaloides en los cultivos de células vegetales: callo-tallo, 3 y 6 semanas de cultivo (3 y 6s); callo-raíz, 12s y callo-hoja, 12s. La reacción histoquímica para la identificación de alcaloides presenta dos coloraciones: café oscuro(a\*) y café-rojizo(a).



### **iii. Lignina**

Se observaron elementos traqueales en secciones longitudinales y transversales. Se identificaron mas elementos traqueales en los cultivos de raíz, distribuidos en toda la muestra. La prueba de lignina permitió diferenciar el desarrollo del tejido vascular durante los diferentes períodos de subcultivo. Fue muy evidente el desarrollo temprano de haces vasculares en los callos provenientes de los explantes de: raíz, tallo y hoja. Durante las primeras semanas de subcultivo (3-6 semanas) se observó una formación importante del tejido vascular. En las observaciones subsecuentes el desarrollo de este tejido aumentó.

En el callo-ápice, fue a partir de la semana 12 de subcultivo en donde se inició el desarrollo de haces vasculares, localizados principalmente en la zona central de las secciones. Sin embargo, en algunas muestras correspondientes a las primeras semanas de subcultivo que aún no se habían desdiferenciado totalmente se observaron restos de tejido vascular, correspondiente a fragmentos del explante.

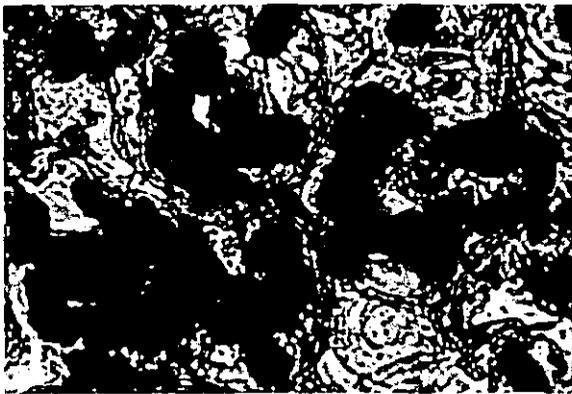
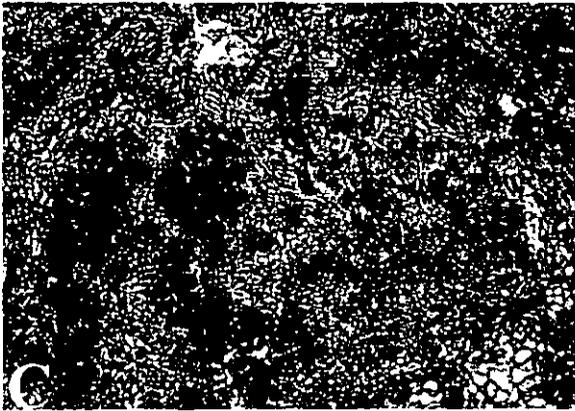
### **iv. Almidón.**

La presencia de amiloplastos fue muy abundante en todas las muestras sobre todo en las muestras que tenían mayor tiempo de subcultivo (semana 21).

*d. Detección de N,N,-dimetiltriptamina.*

En los diferentes ejemplares de callo se confirmó la presencia de N,N,-dimetiltriptamina, solamente en los callos producidos a partir de raíz y tallo, sin embargo, en los callo de ápice y hoja no se detectó este compuesto. El tiempo de retención del extracto de referencia (5-metoxi-Nb, Nb,-dimetiltriptamina) fue de 17.61, para raíz 15.67 y tallo 19.50. Se comparó los espectros de luz ultravioleta de la referencia con cada una de las muestras de los diferentes callos y únicamente el callo-raíz y callo-tallo muestran similitud con la referencia. Finalmente, se realizó la cuantificación aproximada obteniéndose 0.85g de compuesto para la raíz y 0.80g para el tallo.

La DMT, es un compuesto químico producido por el reino vegetal y no es producida por los mamíferos, esta característica facilitará su utilidad como marcador para su identificación en la sangre y en la orina. Es decir, será utilizado como marcador de los trasplantes de células vegetales en mamíferos y de esta manera se corroborará su presencia en el torrente sanguíneo y en la orina.



**Figura 34.** Serie de microfotografías que muestran la presencia de almidón (al) en los diferentes cultivos celulares.

A. - callo-raíz, 12 semanas de cultivo.

B. - callo-tallo, 3 semanas de cultivo.

C. - callo-hoja, 12 semanas de cultivo.

D. - callo-ápice 3 semanas de cultivo.

E. - callo-ápice 3 semanas de cultivo. Acercamiento de la imagen D, presencia de almidón en el citoplasma de la célula.

## V. Conclusiones.

- Los callos presentaron diferentes características morfológicas (textura y color) según el explante utilizado para los cultivos celulares.
- Las características morfológicas y anatómicas estuvieron relacionadas de acuerdo al tipo de explante donador y a la etapa de desarrollo del callo.
- De acuerdo a las observaciones microscópicas, los diferentes callos obtenidos fueron anatómicamente heterogéneos. Es decir, estaban constituidos por células parenquimáticas polimorfas, células de almacenamiento, células meristemáticas y por un tejido de conducción.
- Los callos obtenidos a partir de los diferentes explantes desarrollaron tejido vascular. Sin embargo, la diferencia radicó en el grado de diferenciación y en el tiempo de subcultivo en el que se observó. Es decir, algunos completaron tardíamente la formación de haces vasculares mientras que otros lo hicieron desde las primeras tres semanas de subcultivo.
- Los callos producidos a partir de los explantes de tallo, raíz y hoja formaron su tejido vascular a partir de la semana seis de subcultivo. Estos mismos cultivos se caracterizaron por desarrollar crecimiento secundario y crecimiento anómalo.
- Los explantes de hoja y raíz presentaron pocas ventajas para lograr su desdiferenciación principalmente porque es un material que se oxida muy fácilmente.
- El ápice fue el explante mas adecuado para la producción de callo ya que es una porción del vegetal que está en crecimiento activo, esta característica facilitó la obtención de un callo con un menor grado de diferenciación y friable.

- El callo de ápice se caracterizó por su composición mayoritaria de células parenquimatosas. Sin embargo después de la semana 15 se observó el inicio de la diferenciación de tejido vascular.
- El tiempo óptimo para obtener el callo a partir de explantes de ápice para su utilización en los sistemas de liberación fue entre la semana nueve y doce de subcultivo.
- El callo obtenido a partir de explantes de tallo se desdiferencio de una forma lenta y debido a la gran concentración de taninos que lo caracterizó el material presento algunas áreas oxidadas.
- Los compuestos ergásticos más abundantes fueron el almidón y los taninos.
- La presencia de amiloplastos aumentó en los callos que correspondían a la semana 21 de subcultivo.
- La presencia de taninos se observó a partir de las primeras tres semanas de cultivo y la acumulación de estos compuestos aumentaba en relación con el tiempo.
- De acuerdo a las observaciones microscópicas, las células que contenían taninos, saponinas y alcaloides se distribuían de dos formas muy típicas: 1) en la periferia de las secciones y 2) en el tejido vascular.
- Los callos obtenidos en la última semana de subcultivo a partir de explantes de tallo y raíz estaban constituidos por abundantes células que contenían taninos.
- Los estudios de cromatografía por HPLC indicaron una mayor concentración de la DMT en el callo obtenido a partir de explantes de tallo.

## VI. Bibliografía.

- 1) Camargo S. Aspectos de la biología del "tepescohuite", *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae), en México (tesis). México (DF): UNAM, 1996.
- 2) Camargo-Ricalde S, Grether R, Martínez-Bernal A. Uso medicinal del "tepescohuite", *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae), en México. Contacto 1994;5:29-34.
- 3) Grether R. A general review of the genus *Mimosa* L. (Leguminosae) in México. Bull. IGSM 1978;6:45-50.
- 4) Camargo-Ricalde S, Grether R, Martínez-Bernal A. Cuatro especies oportunistas del género *Mimosa* (Leguminosae) en México. Contacto 1995;10:5-15.
- 5) Hernández R. y Rivera R. Plantas Medicinales de los géneros *Acacia* y *Mimosa* (Leguminosae) utilizadas en la medicina tradicional Mexicana (Tesis). México (DF): UNAM, 1989.
- 6) Gupta M. and Arias T. The occurrence of tryptamine and N-metiltryptamina in *Mimosa somnians*. Journal of Natural Products 1979; 42(2):324-236.
- 7) Szara ST. Dimethyltryptamin: its metabolism in man; the relation of its psychotic effect to the serotonin metabolism. Experientia 1956; 12(2): 442.
- 8) Smith T. Tryptamine and related compounds in plants. Phytochemistry 1977;16: 171-175.
- 9) McKenna D, Towers GHN and Abbott F. Monoamine oxidase inhibitors in south american hallucinogenic plants: tryptamine and  $\beta$ -carboline constituents of ayahuasca. Journal of Ethnopharmacology 1984;10: 195-223.
- 10) Shultes RE, Hoffmann A. The botany and chemistry of hallucinogens. Springfield: Charles C. Thomas, 1980.

- 11) Lozoya X, Navarro V, Arnason JT, Kourany E. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (willd) Poir. (Tepescohuite) I. Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. Arch Invest Med 1989;20(1):87-93.
- 12) Meckes-Lozoya M, Lozoya X, González JL. Propiedades farmacológicas in vitro de algunos extractos de *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite) 1990;21(2):163.
- 13) Meckes-Lozoya M, Lozoya X, González JL, Martínez M. Efecto producido por la fracción de alcaloides de *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite) sobre el reflejo peristáltico del íleon del cobayo 1990; 21(2):171.
- 14) Meckes-Lozoya M, Lozoya X, Marles RJ, Chantalsoucy-Breau A, Arnason J. n,n,-dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* bark (tepescohuite). Arch Invest Med 1990;21(2):175-177.
- 15) Villareal ML, Nicasio P, Alonso-Cortés D. Effects of *Mimosa tenuiflora* bark extracts on W138 and KB human cells in culture. Arch Invest Med 1991;22(2): 163-169.
- 16) Jiang Y, Massiot G, Lavaud C, Teulon JM, Guéchet C, Haag-Berrurier M, Anton R. Triterpenoid glycosides from the bark of *Mimosa tenuiflora* 1991;30(7):2357-2360.
- 17) Jiang Y, Haag-Berrurier M, Antón R. Structure of a new saponin from the bark of *Mimosa tenuiflora*. Journal of Natural Products 1991;54(5): 1247-1253.
- 18) Antón R, Jiang Y, Weniger B, Beck JP, Rivier L. Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret. J. Ethnopharmacology 1993;338:153-157.
- 19) Domínguez X, García S. Kuulkanins A and B, new chalcones from *Mimosa tenuifolia*. J Nat Prod 1989;52(4): 864-867.

- 20) Villareal ML, Rojas G. *In vitro* propagation of *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret, a mexican medicinal tree. Plant Cell Reports 1996;16:80-82.
- 21) Nicasio P. Evaluación de aminos triptamínicos en cultivo in vitro de *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret Leguminosae "Tepescohuite" (tesis). Cuernavaca (Mor): Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 1995.
- 22) Villareal M, Rojas G, Meckes M, Nicasio P. Studies on *Mimosa tenuiflora* callus culture. Interaction of kinetin and 2,4 dichlorophenoxy acetic acid in initiation and growth. Biotechnol Lett 1993;15(7): 271.
- 23) Fowler M, et al. The use of plant cell cultures for natural product synthesis. In: Bioactive compounds in plants. New York: John Wiley & Sons, 1990:157.
- 24) Hall T, et al. Opportunities for bioactive compounds in transgenic plants. In: Bioactive compounds in plants. New York: John Wiley & Sons, 1990: 177.
- 25) Hoffer BJ, Van Horne C. Survival of dopaminergic neurons in fetal-tissue grafts. N Engl J Med 1995 Apr; 332(17):1163-4.
- 26) Davalli A; Ogawa Y; et al. A selective decrease in the beta cell mass of human islets transplanted into diabetic nude mice. Transplantation 1995 Mar;59(6).
- 27) Faustman D. Strategies for circumventing transplant rejection: modification of cells, tissues and organs. Trends Biotechnol 1995;13(3): 100-5.
- 28) Okuda H, Toguchi H. Biodegradable microspheres in drug delivery. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1995;12(1):1-99.
- 29) Gebhardt BM; Kaufman HE. Collagen as a delivery system for hydrophobic drugs: studies with cyclosporine. J Ocul Pharmacol Ther 1995;11(3): 319-27.

- 30) Leussen HL, Verhoef JC, Borchard G, et al. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery II carbomer and polycarbophil are potent inhibitors of the intestinal proteolytic enzyme trypsin. *Pharm Res* 1995 Sep;12(9):1293-8.
- 31) Grimaldi S, Guiliani A, Ferroni L, et al. Engineered liposomes and virosomes for delivery of macromolecules. *Res Virol* 1995 Jul-Aug; 146(4): 289-93.
- 32) Langer R. New methods of drug delivery. *Science* 1990;249:1527-1533.
- 33) Aebischer P, Trecco P, Winn S, Greene L. And Jaeger C. Long-term cross-species brain transplantation of a polymer-encapsulated dopamine-secreting cell line. *Experimental neurology* 1991;11: 269-275,.
- 34) Lozoya X, Arellano M, Rivera E, Domínguez F. Los injertos planta-animal o trasplantes inter-regni. *Ciencias* 1995:28-35.
- 35) Lozoya X, Madrazo I, Guizar G y cols. A selective decrease in the beta cell mass of human islets transplanted into the subcutaneous tissue of rats. *Arch Med Res* 1995; 26(1):85.
- 36) Lozoya X, Rivera-Arce E, Domínguez F. Fitofármacos implantados en animales: un método en desarrollo. En: Lozoya X, Gómez E, ed. *Fitofármacos. Primer Simposio IMSS Farmasa Schwabe; 1997 May; México (D. F.), México.*
- 37) Rivera-Arce E, Sandoval E, Nicasio P, Rojas G, Lozoya X. Survival and differentaion of cultured plants cells grafted in an animal host. *Fitofármacos. En prensa.*
- 38) Curtis, J. *Microtecnia Vegetal*. Curtis, J. *Microtecnia Vegetal*. México; Trillas, S. A. de C. V., 1986.
- 39) Ruzin, S. *Plant Microtechnique and microscopy*. New York: Oxford University Press, 1999.

- 40) Johansen, D. Plant Microtechnique. New York-London: McGraw-Hill, 1968.
- 41) Jiménez E, Quiala. Inmovilización celular. En: Pérez Ponce JN, ed. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Cuba: Instituto de Biotecnología de las plantas, 1998.
- 42) Lindsey K, Jones MGK. Biotecnología Vegetal Agrícola. España: Acribia, S.A., 1989.
- 43) Alvarez B. "Cultivo de callos" En: Hurtado D, Merino ME, ed. Cultivo de tejidos vegetales. México: Trillas, 1987: 93-100
- 44) Jiménez E. Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez Ponce JN, ed. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Cuba: Instituto de Biotecnología de las plantas, 1998:45.
- 45) Gómez R. Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce JN, ed. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Cuba: Instituto de Biotecnología de las plantas, 1998:57.
- 46) Gómez R. Cultivo de células y tejidos. En: Pérez Ponce JN, ed. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Cuba: Instituto de Biotecnología de las plantas, 1998:25.
- 47) Cassab G. Cultivo de células y organogénesis in vitro de tejidos de *Bouvardia ternofolia* (tesis). México (D.F.): UNAM, México, 1981.
- 48) Locquin, M., Langeron, M. Manual de Microscopia. España: Labor, S. A., 1985.
- 49) Windholm J. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Technol 1972; 47(4): 189-194.

**VII. Anexos.****FAST GREEN**

Solución A. Solución saturada de fast green en etanol absoluto ----- 1 parte

Metilcelosolve en igual cantidad de alcohol absoluto ---- 1 parte

Solución B. Etanol absoluto ----- 25 partes

Aceite de clavo ----- 75 partes

Se mezcló la solución B con la solución A.

**SAFRANINA**

Safranina O ----- 1 g

Metilcelosolve ----- 50 cc

Etanol del 96 % ----- 25 cc

Agua destilada ----- 25 cc

Acetato de sodio ----- 1 g

Formol comercial ----- 2 cc

Se disolvió la safranina en el metilcelosolve, posteriormente se agregó alcohol, agua, acetato y formol.

**FAA**

Para preparar un litro de la solución se utilizó:

Formaldehído ----- 100ml

Ácido acético glacial ----- 50ml

Alcohol etílico 96° ----- 500ml

Agua común ----- 350ml

**MEDIO KNOP**

Nitrato de potasio	0.125g/l
Nitrato de calcio	0.500g/l
Sulfato manganoso	0.125g/l
Fosfato de potasio monobásico	0.125g/l

**SOLUCIÓN ORGÁNICA**

Solución stock:	mg/l
Myoinositol	100mg/l
Tiamina	50mg/l
Piridoxina	50mg/l
Ac. Nicotínico	10mg/l

**SOLUCIÓN INORGÁNICA**

Solución stock	mg/l
Nitrato de amonio	16500
Acido Bórico	63
Cloruro de calcio	4400
Cloruro de cobalto	0.25
Sulfato cúprico	0.25
Sulfato ferroso	278
Sulfato de magnesio	3700
Sulfato de manganeso	169
Yoduro de potasio	8.3
Nitrato de potasio	19000
Fosfato de potasio	1700

Sal sódica de etilen dinitril

tetracetato 373

Molibdato de sodio 2.5

Sulfato de zinc 86

#### MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE AND SKOOG

Solución inorgánica 100ml/l

Solución orgánica 10ml/l

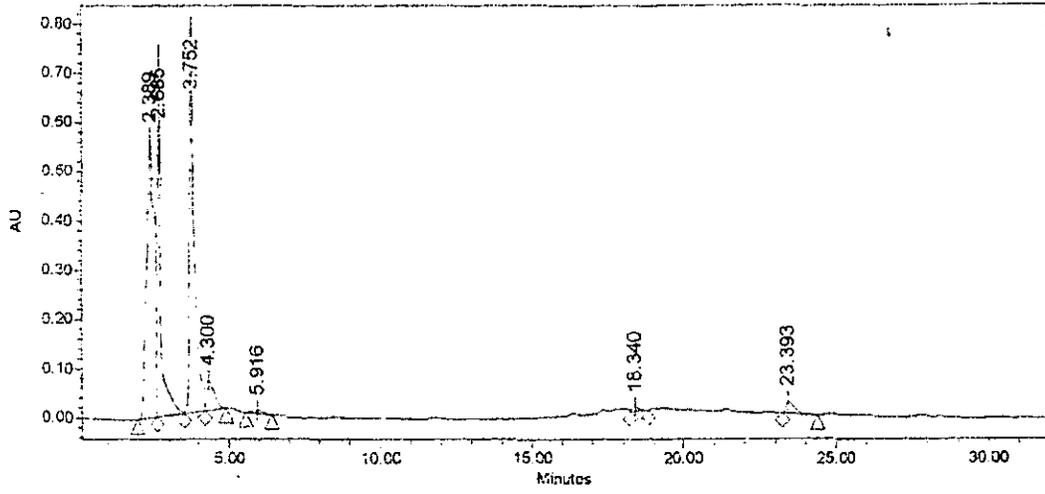
Sacarosa 30g/l

2,4-D 2mg/l 2ml/l

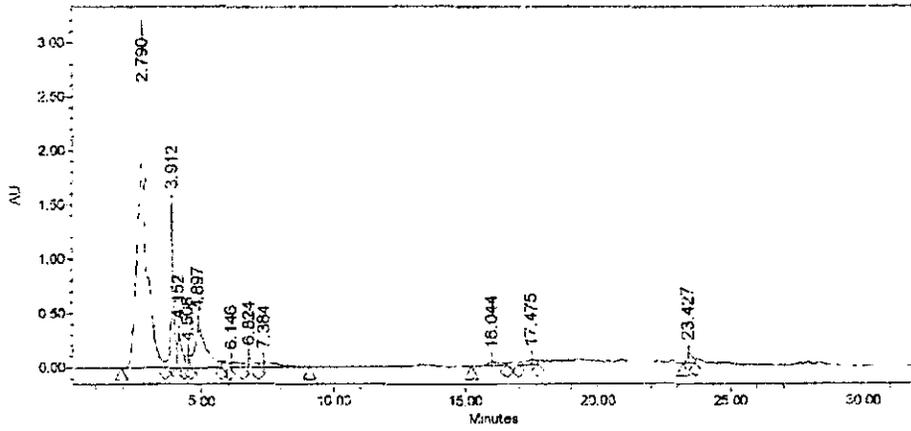
Cinetina 2ml/l

Agar 7g/l

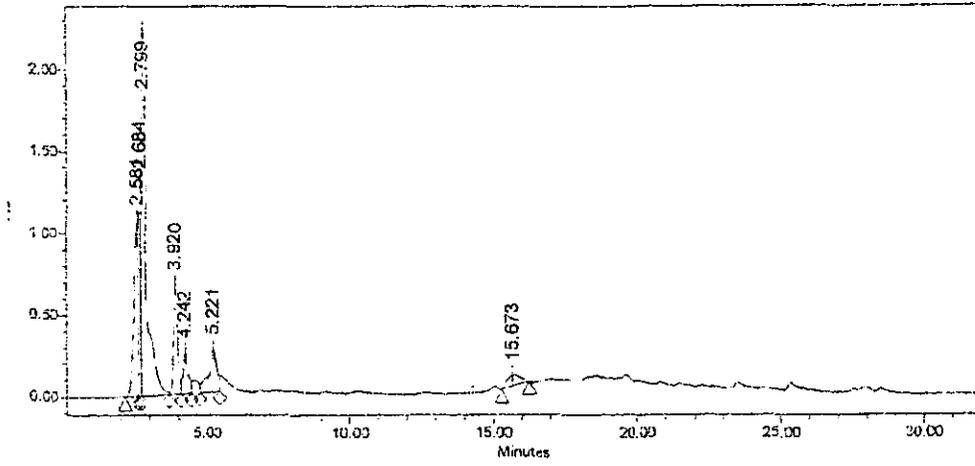
Extracto MeOH *mimosa tenuiflora* (hoja)



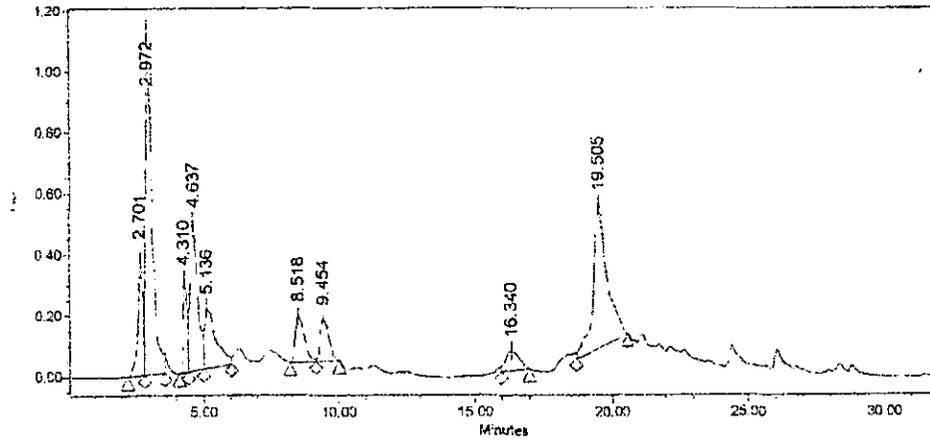
Extracto MeOH *mimosa tenuiflora* (ápices)



Extracto MeOH mimosa tenuiflora (raiz)



Extracto MeOH mimosa tenuiflora (tallo)



15.673  
15.679  
17.612

Espectro de referencia de la N,N-  
dimetiltriptamina.

Tiempo de retención : 17.612

