



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"

**INDUCCION DE LA FORMACION DE TEJIDO CALOSO  
DE Digitalis purpurea**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A :

**PATRICIA PARRA CERVANTES**

Asesora: Dra. Carmen Giral Barnes





## **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 está 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.

# I N D I C E

Página

## INTRODUCCION

1.0	FUNDAMENTACION	1
1.1	Historia	1
1.2	Clasificación, fuentes y distribución	1
1.2.1	Clasificación	1
1.2.2	Fuentes	3
1.2.3	Distribución	3
1.3	Composición química	5
1.4	Métodos sintéticos	8
1.5	Farmacología	8
1.6	Aspectos socioeconómicos	8
1.6.1	Incidencia de enfermedades cardiovasculares	8
1.6.2	Producción y comercio	11
1.7	Cultivo de tejidos vegetales	16
1.7.1	Antecedentes	16
1.7.2	Fuente vegetal para cultivo de tejidos	17
1.7.2.1	Selección del órgano/tejido	17
1.7.2.2	Fase de desarrollo del tejido	17
1.7.2.3	Tratamiento de la fuente vegetal	17
1.7.2.4	Tamaño del explante	18
1.7.2.5	Desinfestación del explante	18
1.7.3	Controles del medio ambiente	18
1.7.3.1	Condiciones nutricionales	18
1.7.3.2	Fuente de Carbono	19
1.7.3.3	Fuente de nitrógeno	19
1.7.3.4	Fuente de fósforo	19
1.7.3.5	Vitaminas	19
1.7.3.6	Reguladores de crecimiento	19
	AUXINAS	20

	CITOCININAS	20
	GIBERELINAS	22
	ETILENO	22
		22
1.7.3.7	Precursores	22
1.7.3.8	Factores Físicos	24
1.8	Controles Biológicos	24
1.8.1	Crecimiento	24
1.8.2	Morfogenesis de células en cultivo	25
1.8.3	Variación biosintética por productos secundarios	26
1.8.4	Inducción de tejido caloso	26
1.8.5	Morfología y citología	26
1.8.6	Conservación de células vegetales	28
1.8.7	Obtención biotecnología de glucósidos cardíacos por cultivo de células vegetales	29
2.0	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
3.0	OBJETIVOS	35
4.0	HIPOTESIS	34
5.0	MATERIAL Y METODOS	35
5.1	Material	35
5.1.1	Equipo	35
5.1.2	Material	35
5.1.3	Reactivos	35
5.2	Métodos	37
5.2.1	Recolección del material biológico	37
5.2.2	Preparación del medio de cultivo	37
5.2.3	Proceso de desinfestación de semillas y plántulas	40
5.2.4	Proceso de siembra de las semillas	40

5.2.5	Proceso de siembra para la inducción del callo.	41
5.2.6	Incubación	41
5.2.7	Parámetros de crecimiento del tejido calloso	42
5.2.7.1	Evaluación de peso fresco	42
5.2.7.2	Evaluación de peso seco	42
5.2.7.3	Dispersabilidad celular	43
5.2.8	Extracción de glucósidos cardíacos de plántulas y tejido calloso	43
5.3	Métodos de identificación de los glucósidos cardíacos	44
5.4	Resiembra	44
6.0	DESARROLLO EXPERIMENTAL	44
6.1	Evaluación de la viabilidad de las semillas de <u>Digitalis purpurea</u>	44
6.2	Germinación de las semillas	46
6.3	Elección del tipo y concentración del agente desinfectante	46
6.4	Elección del explante más adecuado para la inducción de tejido calloso	46
6.5	Efecto del balance hormonal	47
6.6	Implementación del proceso de extracción de los glucósidos cardíacos a partir de plántulas y tejido calloso	47
7.0	RESULTADOS Y DISCUSION	50
7.1	Germinación no controlada	50
7.2	Germinación controlada	50
7.3	Efecto del balance hormonal en la germinación	52
7.4	Elección del explante más adecuado para inducir callo	54
7.4	Parámetros de Crecimiento	56
7.5.1	Evaluación de Peso Seco	56
7.5.2	Evaluación de Peso Fresco	56
7.5.3	Curva de Crecimiento	56
7.6.	Efecto del balance hormonal en la inducción del callo	60

7.7	Efecto del fotoperíodo en la inducción del tejido calloso	60
7.8	Evaluación del porcentaje de diferenciación	65
7.9	Disgregación celular	65
8.0	DETECCION DE GLUCOSIDOS CARDIACOS	65
9.0	CONDICIONES MAS ADECUADAS PARA LA INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO	68
10.0	CONCLUSIONES	69
11.0	RECOMENDACIONES	70
12.0	BIBLIOGRAFIA	71

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	DIGITALIS	2
2	SINTESIS DE SONDHEIMER	9
4	INDICE DE MORTALIDAD GLOBAL MUNDIAL vs INDICE - PROENFERMEADES CARDIOVASCULARES	10
5	VALOR DE IMPORTACIONES COMPARATIVAS DE --- ACETILDIGOXINA	14
6	VALOR DE IMPORTACIONES COMPARATIVAS DE LANATOSI DO C	15
7	ESTRUCTURAS AUXINAS	21
8	ESTRUCTURAS CITOCININAS	23
10	ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	45
11	ELECCION DEL EXPLANTE MAS ADECUADO	47
12	MATRIZ EXPERIMENTAL	48
13	PROCESO DE EXTRACCION DE LOS GLUCOSIDOS CARDIA- GOS	49
14	INTERRELACION DE BALANCE HORMONAL AUXINA/CITOCI NINA CON RESPECTO A PESO SECO	58
15	CURVA DE CRECIMIENTO PARA HIPOCOTILO DE -- <u>Digitalis purpurea</u>	61

## INDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
I	% GLUCOSIDOS CARDIACOS EN DISTINTAS ESPECIES DE DIGITALIS	4
II	MORTALIDAD DE ORDEN DE IMPORTANCIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	12
III	% CONTAMINACION PARA PLANTULAS	51
IV	% CONTAMINACION PARA SEMILLAS	53
V	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS AGENTES DESINFESTANTES	54
VI	ELECCION DEL EXPLANTE MAS ADECUADO	55
VII	INDICE DE PESO SECO PARA CALLOS DE <u>D.purpurea</u>	57
VIII	INDICE DE PESO SECO PARA CALLOS DE <u>D.purpurea</u> EN LUZ CONTINUA	57
IX	INDICE DE PESO FRESCO PARA CALLOS DE <u>D.purpurea</u> INCUBADOS EN LUZ	59
X	INDICE DE PESO FRESCO PARA CALLOS DE <u>D.purpurea</u> INCUBADOS EN OSCURIDAD	59
XI	% DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO A LAS 2 SEMANAS EN LUZ CONTINUA	62
XII	% DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO A LAS 2 SEMANAS EN OSCURIDAD	62
XIII	% DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO A LAS 2 SEMANAS EN FOTOPERIODO	63
XIV	% DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO A LAS 2 SEMANAS EN FOTOPERIODO PARA ANA/cinetina	64
XV	% DE DIFERENCIACION PARA CALLOS A LAS 4 SEMANAS	67
XVI	DETECCION DE GLUCOSIDOS CARDIACOS TANTO EN PLANTULA COMO EN CALLO A DIFERENTES EDADES	68
XVII	CONDICIONES MAS ADECUADAS PARA LA INDUCCION DE TEJIDO CALOSO	69

## I N T R O D U C C I O N

La Biotecnología ha sido considerada en la década pasada como una de las alternativas de mayor atractivo potencial en la solución de problemas de alimentación, salud, energía y contaminación, cuya complejidad y magnitud crecen día con día.

Los microorganismos, células vegetales y animales son entes muy versátiles con los cuales es posible concebir que a través de técnicas de fermentación se pueden suministrar al hombre algunos de los productos que requiere para cubrir sus necesidades como: fármacos, alimentos, agentes saborizantes y suspensores, compuestos químicos de gran uso, así como -- energéticos.

El cultivo "in vitro" de células, tejidos y órganos de plantas es una de las ramas de la Biotecnología de la que México y otros países del tercer mundo podrían obtener grandes beneficios a corto y a largo plazo.

En México las actividades en este campo se iniciaron en 1970 a raíz de la firma de un Convenio de Colaboración Científica entre México y Japón . Como ya se mencionó para nuestro país y para otros en situación económica parecida, el empleo de estas técnicas puede aplicarse en la agricultura siendo muy importante en tres aspectos fundamentales :

- a) Micropropagación de cultivos
- b) Preservación de germoplasma agronómico y silvestre
- c) Mejoramiento genético de especies.

El cultivo de Tejidos también contempla aplicaciones dentro de la Industria Química, contando con una Industria Farmacéutica en desarrollo que puede obtener beneficios económicos con la biosíntesis o biotransformación de metabolitos secundarios por células cultivadas "in vitro" , -- siendo esta área la que atañe a este trabajo.se pretende implementar un modelo que permita el dominio de dicha tecnología en la obtención de glucósidos cardíacos. .

Motivo por el cual será necesario un cuidadoso análisis de las perspectivas y de los problemas prioritarios así como la creación de un sistema que coordine la investigación y optimice esfuerzos.

Es fundamental que una Tecnología potencialmente importante como lo es el cultivo de células vegetales, esté íntimamente ligada a la realidad social y económica del país.<sup>59</sup>

## 1.0 FUNDAMENTACION

### 1.1 HISTORIA

La principal fuente de obtención de los glucósidos cardíacos es el género Digitalis, de las especies Digitalis lanata y Digitalis purpurea ( la primera originaria de los Balcanes y la segunda de la Península Ibérica), descrita por primera vez en el Dioscórides , en el cual se hacían juicios respecto a su acción terapéutica, se sabía que era venenosa pero se le utilizaba como panacea para curar desde un catarro y hasta se decía que servía para curar tuberculosis. Hieronymus Tragus la denominó digitalis del género digitus ( que significa dedo ) en Estraburgo en --- 1539. Es en 1775, que el Dr. William Whithering practica con digitalis y se dice que una hechicera de Stanford Inglaterra es la que le enseña a utilizarla efectivamente.<sup>16</sup>

La Digital consta de un gran tallo con preciosas flores, en forma de dedal y sus hojas parecen lenguas de dragón fig. 1, la digital dependiendo de su especie varia en color y forma pero muy ligeramente. La digital nativa de Europa, se tenía como planta ornamental por su gran belleza en casi todos los jardines y como tal entró al nuevo mundo.

Después de haber sido enviada como regalo, se escapó de los jardines y ahora crece libremente por todos los Estados Unidos de Norteamérica.<sup>16</sup>

### 1.2 CLASIFICACION, FUENTES Y DISTRIBUCION DEL GENERO DIGITALIS

#### 1.2.1 CLASIFICACION

Digitalis purpurea es una planta bienal que florece de mayo a junio , a veces perennizante , en el primer año crece un rosetón de hojas a raz del suelo y cuyo diametro llega a medir hasta 70 cm dependiendo de la región, entallece al segundo año y echa un vástago que puede crecer hasta cerca de 2m. Sus hojas estan sostenidas por un rabillo que se acorta hasta desaparecer en las superiores, las cuales pueden escurrirse a lo

FIGURA 1. DIGITALIS



largo del tallo y tienen forma variable, generalmente entre aovada y lanceolada o mas ancha con la enervadura saltada al envés ,posee vellosidades y es de color blanco, por el mismo.

La flor mide de 3 a 5 cm y es aventriculada en el centro con motitas negras en su interior. Sus semillas son tan pequeñas que apenas miden unos milímetros y están contenidas en un fruto muy pequeño, el cual produce cientos de ellas .

La Digitalis lanata es roja y sus flores son más pequeñas, pero también tienen forma de dedal. La clasificación botánica de Digitalis purpurea es la siguiente :

REINO	Vegetal
DIVISION	Espermatophyta
SUBDIVISION	Angiospermeae
CLASE	Dycotiledoneae
ORDEN	Tubifloreae
SUBORDEN	Solalineaee
FAMILIA	Crophulariaceae
GENERO	<u>Digitalis</u>
ESPECIE	<u>Digitalis purpurea</u>

### 1.2.2 FUENTES

Digitalis tiene un mayor contenido de glucósidos cardíacos que otros géneros, es por esto que se siguen extrayendo del mismo, variando el contenido dentro de sus mismas especies como se observa en la tabla I.

México cuenta con una alternativa en la obtención de glucósidos cardíacos, en el género Thevetia que se encuentra de manera silvestre y distribuido ampliamente en todo el país. Al respecto se han realizado estudios en donde Syntex y ENEP Zaragoza<sup>47,38</sup> evalúan la obtención de digi toxigenina a partir de semillas de Thevetia.

### 1.2.3 DISTRIBUCION

La Digitalis habita en regiones boscosas altas, con clima Húme

TABLA I.- % GLUCOSIDOS CARDIACOS EN DISTINTAS ESPECIES DE Digitalis

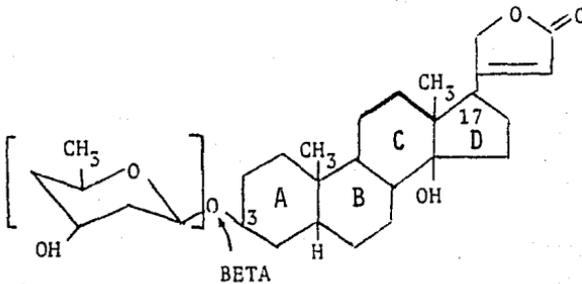
<u>D. lutea</u> Subesp. Australis	30	glucósidos	identificados	2 no identificados.
<u>D. dubia</u>	31	"	0.47%	
<u>D. davisiana</u>	13	"	0.15%	
<u>D. grandiflora</u>	23	"	0.26%	
<u>D. viridiflora</u>	22	"	0.19%	1 no identificado.
<u>D. leavigata</u>	24	"	0.14%	5 no identificados.
<u>D. ferruginea</u> <u>Schiskinii</u>	33	"	0.40%	
<u>D. cariensis</u> <u>lamarckii</u>	39	"	0.63%	
<u>D. purpurea</u>			0.5%	

do pero soleado; de suelos síliceos o descalcificados. Generalmente crece acompañando a los robles y abetos, arraigando en las fisuras de las rocas y peñascos desde el nivel del mar hasta unos 1000 m de altura.

México cuenta con una especie aloctona en los estados de Puebla, -- Hidalgo y Sur de Veracruz de Digitalis purpurea, de la cual se extraen los glucósidos cardíacos, y desafortunadamente no se han realizado estudios para la domesticación de su cultivo. Motivo por el cual es importante realizar investigaciones al respecto, además de montar procesos de extracción y separación de los glucósidos cardíacos.

### 1.3 COMPOSICION QUIMICA

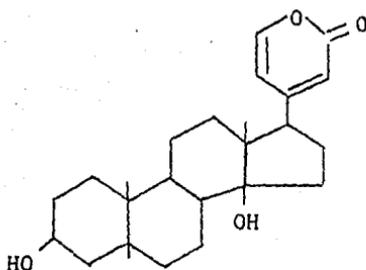
Los glucósidos cardíacos aislados de fuentes naturales están constituidos estructuralmente por un núcleo esteroidal (anillo del ciclopentano-perhidro fenantreno), conocido como aglucona o genina, la cual en el C-3, se encuentra unida por medio de un enlace glucosídico a un monosacárido, o a una cadena de éstos y cuya estructura (I) es la siguiente:



GENINA (I)

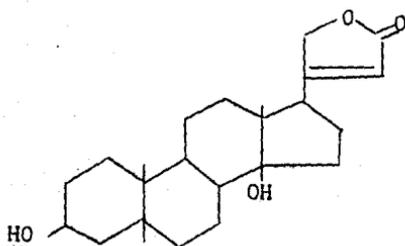
Los cardenólidos como suele denominarseles también contienen C-23 ya que en el C-17 el esteroide está unido a un anillo de lactona insaturado. Existe otro tipo de glucósidos, denominados bufadienólidos cuya estructura es similar a la de los cardenólidos, éstos poseen en el --

C-17 una lactona de seis miembros, una  $\alpha$ -pirona o hexadienólido, y por consiguiente se convierte en una estructura de C-24 (II):

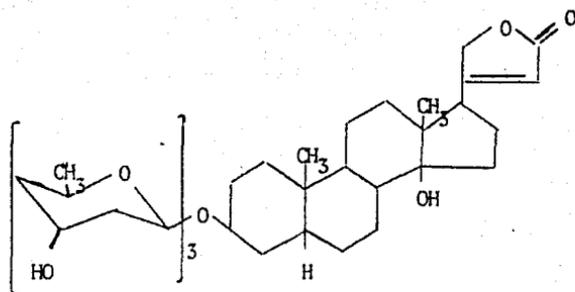


$\alpha$  - pirona o hexadienólido (II)

La digitoxigenina (III) es la aglucona más sencilla aislada hasta el momento de fuentes naturales, con acción cardiotónica, sin embargo la utilizada es la digoxina (IV); su diferencia radica en que esta posee un grupo OH, unido en el C-14, la estructura es la siguiente:

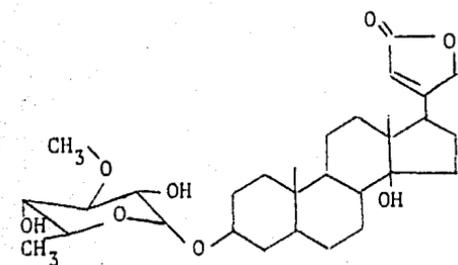


digitoxigenina (III)

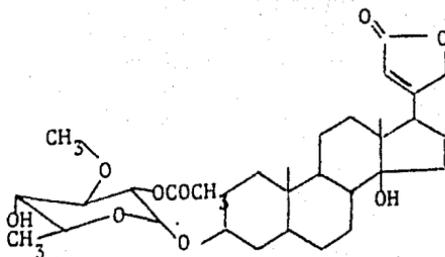


digoxina (IV)

La digitoxigenina (III), se puede aislar también en forma práctica a partir de la nerifolina(V) y de la 2'-acetilnerifolina (VI) que se encuentran contenidos en la semilla de Thevetia, según estudios realizados en Syntex y ENEP Zaragoza<sup>47,38</sup>.



nerifolina (V)



2'-acetilnerifolina (VI)

#### 1.4 METODOS SINTETICOS

Los intentos de síntesis han sido en vano y la única que se ha podido realizar es a partir de 3 - -acetoxi-5- -androstan-17-ona y donde obtener el 14- -hidroxi-20-oxisteroide es difícil y por lo tanto no es -costeable, la síntesis fué llevada a cabo por Sondheimer y se puede apreciar en la fig. 2.

#### 1.5 FARMACOLOGIA

La acción farmacológica de digitalis se puede resumir como sigue:

- a) Aumento de la contractilidad del músculo cardíaco (actividad inotrópica)
- b) Prolonga el período refractario del nódulo atrioventricular y del Haz de Hiss disminuyendo la frecuencia cardíaca.
- c) Aumenta la sensibilidad del nódulo sinoatrial al control del vago.

Su acción a nivel celular no está definida sólo la que ejerce en - el músculo cardíaco anormal y no en el normal. Se sabe que inhibe el transporte de sodio y potasio a través de la membrana del eritrocito y existen evidencias de que posiblemente esta acción sólo se ejerza en la distribución de potasio.

#### 1.6 ASPECTOS SOCIOECONOMICOS

##### 1.6.1 INCIDENCIA DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Según estadísticas recientes del Instituto Nacional de Cardiología,<sup>7</sup> México se encuentra dentro de los diez primeros lugares con un mayor índice de mortalidad por enfermedades cardiovasculares a nivel mundial, esto - se puede apreciar claramente en la fig. 1. Al mismo tiempo la mortalidad - por enfermedades cardiovasculares en la República Mexicana también ocupa los primeros lugares, la cual comprende ambos sexos y a todas las edades - revelando que adquieren importancia desde muy temprana edad; aunque la mor - bilidad en estas enfermedades es mayor que el porcentaje de mortalidad; --

FIGURA 2. SINTESIS PROPUESTA POR SONDHEIMER

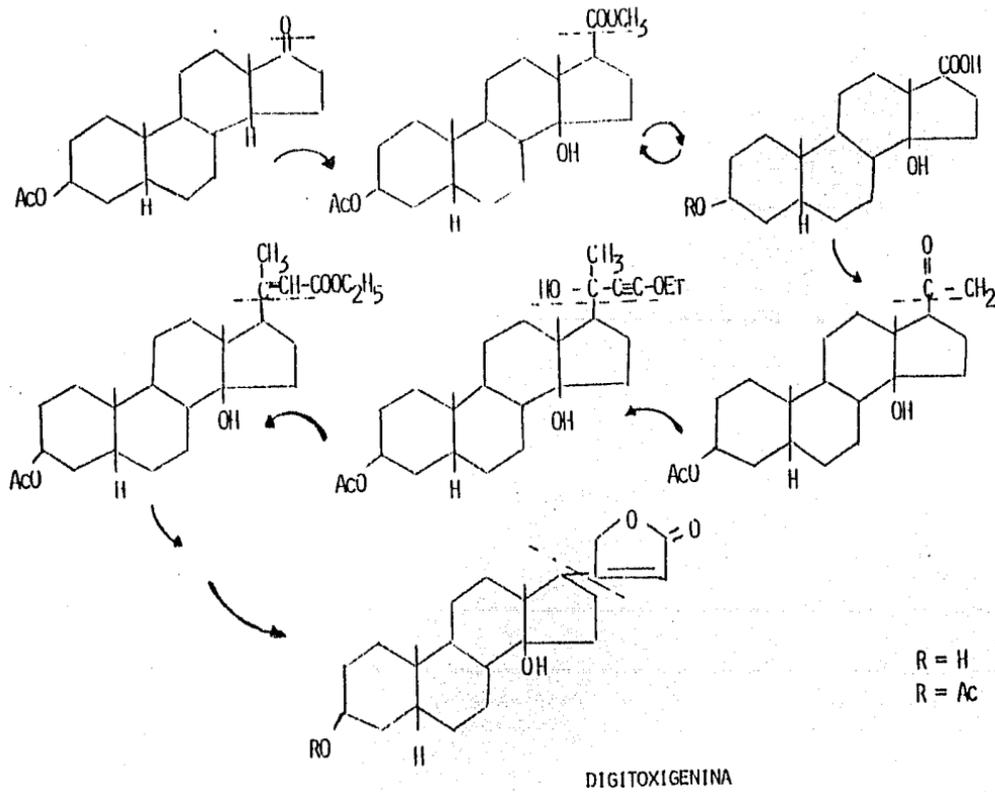
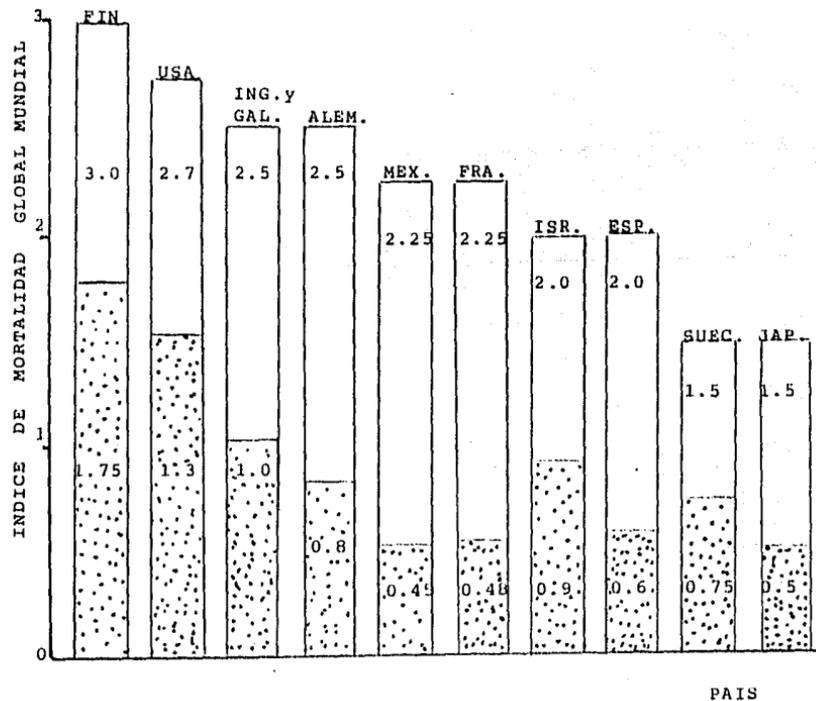


FIGURA 4 INDICE DE MORTALIDAD GLOBAL MUNDIAL EN RELACION A LA INCIDENCIA POR ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES (???)



CLAVES :  
 FIN = FINLANDIA  
 USA = ESTADOS UNIDOS  
 ING. Y G.= INGLATERRA Y  
 GALES  
 ALEM.= ALEMANIA  
 MEX = MÉXICO  
 FRA = FRANCIA  
 ISR = ISRAEL  
 ESP = ESPAÑA  
 SUEC = SUECIA  
 JAP = JAPÓN

también es importante mencionar que estos índices se incrementan en personas mayores de 30 años. Por otra parte la tasa de mortalidad hasta el año pasado por enfermedades del corazón y tumores malignos ha crecido significativamente.

En la República Mexicana, se observa que el índice aumenta en las grandes ciudades como Monterrey, Guadalajara y el Distrito Federal, tal vez debido al agitado ritmo de vida que se lleva en esas ciudades por su alta industrialización como se observa en la tabla II.<sup>7</sup>

Por lo anterior puede decirse que la tendencia de mortalidad cardiovascular es a ir en aumento; va evolucionando con el desarrollo, ya que como observamos las tasas mas altas pertenecen a países industrializados. Por tanto debe ponerse mayor atención al diagnosticar los padecimientos, para poder erradicarlos poco a poco, y un estudio de la mortalidad dá un dato muy objetivo de ello.<sup>7</sup>

#### 1.6.2 PRODUCCION Y COMERCIO

La mayoría de las hojas de digital del comercio se obtenía de plantas silvestres de Oregon, Washington, Nueva York y Europa. Pero los glucósidos de digital son muy lábiles y para asegurar un potencial uniforme S.B. Penick & Co , ( que es la que produce mas de las tres cuartas partes de la digital en E.U.) empezó a cultivarla en campos de Meadow Springs en Oley, Pennsylvania. Ellos hacen crecer a la digital morada o Digitalis purpurea, de retoños nuevos cada año, ya que sólo usan las hojas del primer año; se recogen a mano en otoño, se secan en bandejas y en hornos especiales que controlan el contenido de humedad y de ahí se empaacan en tambores herméticos.

En Europa Meer Corporation y Burroughs Wellcome proporcionan la especie griega D. lanata . El principal problema radica en calibrar su potencia con respecto a un patrón de medida. Dependiendo de la especies de digital el contenido de glucósidos es diferente en cada uno de ellos.

Los glucósidos cardíacos en especial digoxina y digitoxina son los fármacos de primera elección en el tratamiento de éstas enfermedades aún a pesar de su estrecho margen de seguridad. Estos activos son importados en su

TABLA II. MORTALIDAD POR ORDEN DE IMPORTANCIA EN LA REPUBLICA MEXICANA POR ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

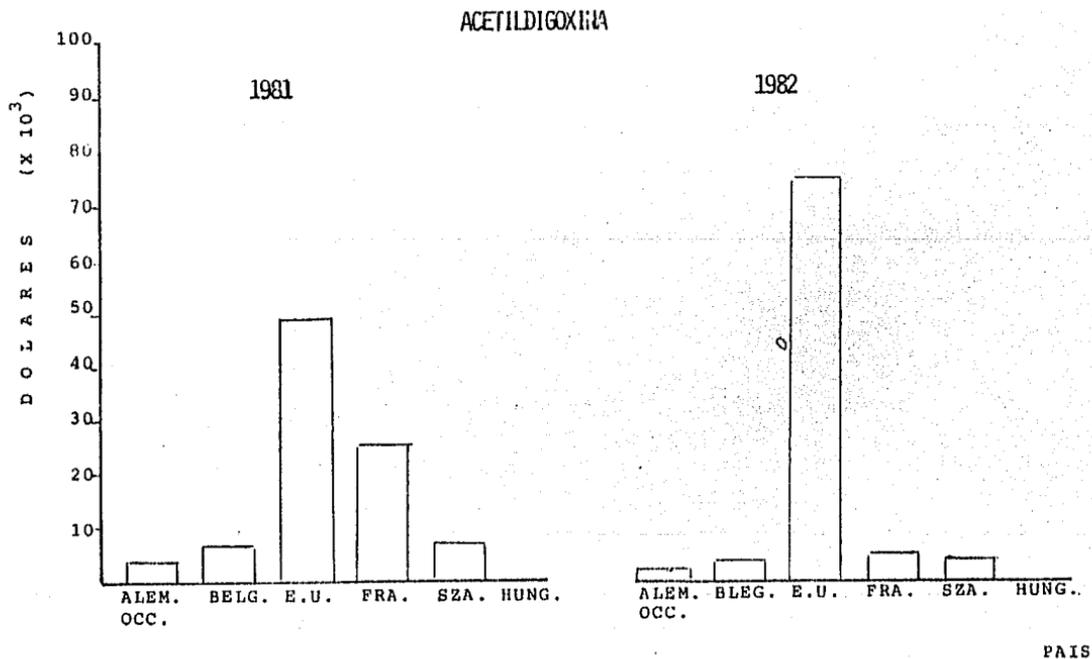
COMPRENDE CINCO ZONAS QUE SON:

ZONAS	% DE INCIDENCIA	ESTADOS QUE COMPRENEN
1	28.1	BCN, SON, SIN, DGO, TAMPS.
2	25.0	NL, MICH, COAH, VER, YUC - NAY, HGO, TAB, CAMP, MOR, - DF.
3	34.4	JAL, COL, ZAC, SLP, CHIS, - AGS, Q.ROO, EDO, MEX.
4	9.4	GRO, PUE, BCS
5	3.1	GRO.

totalidad, son introducidos como Acetildigoxina y Lanatósido C, según reportes del Instituto de Comercio Exterior<sup>46</sup>, Suiza es el principal abastecedor de éstos como se puede observar en las figuras 5 y 6.

México, cuenta con una especie aloctona de D. purpurea de la cual su cultivo no ha sido domesticado por lo que se considera necesario realizar estudios al respecto.

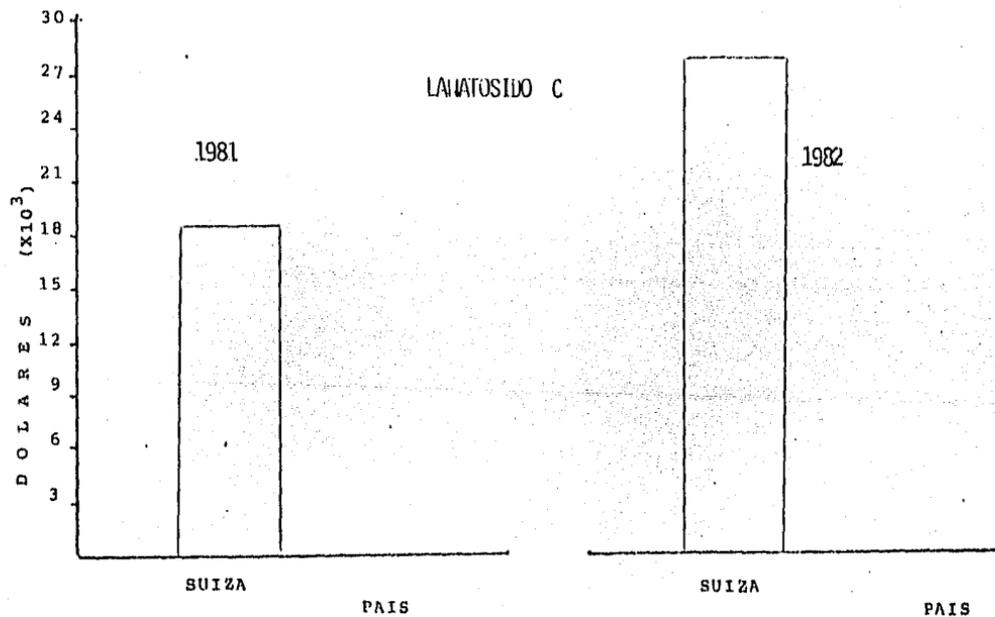
FIGURA 5 VALOR DE IMPORTACIONES COMPARATIVAS POR PRODUCTO-PAIS ENERO/DICIEMBRE 1981-1982



FUENTE : IMCE (1983)

PAIS

FIGURA 6 VALOR DE IMPORTACIONES COMPARATIVAS POR PRODUCTO-PAIS ENERO/DICIEMBRE 1981-1982



FUENTE : IMCE (1983)

## 1.7 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

### 1.7.1 ANTECEDENTES

Antes de 1930 los intentos por cultivar células vegetales o tejidos aislados, como una alternativa para la propagación de los mismos "in vitro" habían fracasado y fué hasta esta fecha que algunos investigadores aportaron técnicas adecuadas para el cultivo de raíces de algunas plantas. En 1938 un cultivo de tejido tumoral de un híbrido de tabaco y callos de Zanahoria contribuyeron favorablemente al desarrollo de esta técnica.<sup>11</sup>

A partir de 1960, la metodología se ha venido desarrollando notablemente, hasta culminar en técnicas altamente especializadas, que se han dado a lo largo de la década pasada, en la cual se ha visualizado un panorama importante en la variedad de vegetales, que se contemplan en el campo de alimentos y medicamentos.<sup>5,7,9,30</sup>

El desarrollo de estas técnicas no se había propiciado, por lo que los dos grupos que tradicionalmente han estudiado este tipo de metodología lo utilizaban con diferentes enfoques, así a los químicos solo les interesaban los cultivos de células para estudios biosintéticos como una alternativa para poder sintetizar en el laboratorio dichos compuestos. En cambio, a los fisiólogos vegetales les interesaban los mecanismos que intervienen en la formación de productos secundarios. Por el contrario la actual integración de grupos multidisciplinarios ha logrado grandes avances en la Ingeniería Genética, han venido a revolucionar estos campos ya que con su ayuda se ha logrado obtener selectivamente y en cantidades considerables compuestos específicos mediante la técnica de cultivo de células vegetales.<sup>31</sup>

El Cultivo de Tejidos vegetales (CVT) es la técnica de hacer crecer células, Tejidos y órganos vegetales en un medio definido y en la ausencia de microorganismos.

Los cultivos de células vegetales pueden efectuarse con diversas partes de la planta por lo que mencionan las siguientes :

- a) Cultivo de Organos .- se aíslan los órganos, incluyendo cultivos de explantes de raíz, tallo, hojas, partes inmaduras de flores y frutos.<sup>5</sup>

## 1.7 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

### 1.7.1 ANTECEDENTES

Antes de 1930 los intentos por cultivar células vegetales o tejidos aislados, como una alternativa para la propagación de los mismos "in vitro" habían fracasado y fué hasta esta fecha que algunos investigadores aportaron técnicas adecuadas para el cultivo de raíces de algunas plantas. En 1938 un cultivo de tejido tumoral de un híbrido de tabaco y callos de Zanahoria contribuyeron favorablemente al desarrollo de esta técnica.<sup>11</sup>

A partir de 1960, la metodología se ha venido desarrollando notablemente, hasta culminar en técnicas altamente especializadas, que se han dado a lo largo de la década pasada, en la cual se ha visualizado un panorama importante en la variedad de vegetales, que se contemplan en el campo de alimentos y medicamentos.<sup>5,7,9,30</sup>

El desarrollo de estas técnicas no se había propiciado, por lo que los dos grupos que tradicionalmente han estudiado este tipo de metodología lo utilizaban con diferentes enfoques, así a los químicos solo les interesaban los cultivos de células para estudios biosintéticos como una alternativa para poder sintetizar en el laboratorio dichos compuestos. En cambio, a los fisiólogos vegetales les interesaban los mecanismos que intervienen en la formación de productos secundarios. Por el contrario la actual integración de grupos multidisciplinarios ha logrado grandes avances en la Ingeniería Genética, han venido a revolucionar estos campos ya que con su ayuda se ha logrado obtener selectivamente y en cantidades considerables compuestos específicos mediante la técnica de cultivo de células vegetales.<sup>31</sup>

El Cultivo de Tejidos vegetales (CVT) es la técnica de hacer crecer células, Tejidos y órganos vegetales en un medio definido y en la ausencia de microorganismos.

Los cultivos de células vegetales pueden efectuarse con diversas partes de la planta por lo que mencionan las siguientes :

- a) Cultivo de Organos .- se aíslan los órganos, incluyendo cultivos de explantes de raíz, tallo, hojas, partes inmaduras de flores y frutos.<sup>5</sup>

- b) Cultivo de embriones .- este se realiza a partir de embriones inmaduros aislados.
- c) Cultivo de callos .- Es la proliferación de células desorganizada a partir de explantes de órganos. Los callos crecen -- usualmente como una masa sobre un medio sólido.
- d) Cultivo en suspensión .- Pequeños agregados de células se dispersan en - un medio de cultivo líquido y con agitación.

Para poder realizar el cultivo de células vegetales hay que tomar en consideración los siguientes aspectos.

#### 1.7.2 FUENTE VEGETAL PARA CULTIVO DE TEJIDOS

El éxito de la técnica de cultivo, depende de las condiciones en que se encuentra la fuente vegetal. Hay una variabilidad considerable asociada con el genotipo de las plantas usadas como inóculos, de aquí que sea importante considerar los siguientes factores :

##### 1.7.2.1 Selección del órgano / tejido

Debe elegirse el más apto para el cultivo de tejido, por lo que se deben realizar forzosamente y para cada órgano, estudios sistemáticos, para comparar cual es el más adecuado.

Aunque se ha considerado que las células vegetales son totipotenciales, se ha observado que existen limitaciones en algunos tipos de células.

##### 1.7.2.2 Fase de desarrollo del tejido

Se ha observado que las plantas jóvenes o en crecimiento son las -- que poseen mayor regeneración en explante, a diferencia de las plantas adultas,. En la fase joven el desarrollo vegetativo es vigoroso y la fase reproductiva es vigorosa y la de crecimiento es lenta en las plantas adultas; ambas son fácilmente distinguibles y pueden estar presentes al mismo tiempo - en la planta.

##### 1.7.2.3 Tratamiento de la fuente vegetal

Es necesario mantener condiciones estandar , para evitar diferencias en el cultivo y mantener la mayor uniformidad posible, para lograrlo -

es necesario tener en cuenta los siguientes requerimientos :

- a) **Requerimientos Estacionales** .- Dependiendo de la estación del año, las diferencias en la regeneración de la planta no son notables, los requerimientos climáticos son por ejemplo: fotoperiodo o temperatura.
- b) **Requerimientos nutricionales**.- Afectan el establecimiento del cultivo vegetal.
- c) **Etiolación** .- Se refiere a los cambios de intensidad de luz sobre la fuente vegetal, en la que ésta puede provocar una respuesta favorable o no.
- d) **Tratamiento con reguladores de crecimiento** .- Estos pueden mejorar las respuestas de los explantes en las condiciones de cultivo.

#### 1.7.2.4 Tamaño del explante

Se sabe que entre mayor es el explante, mayor es la posibilidad de contaminación, por lo que éste debe ser de un tamaño mínimo, pero suficiente para inducir el cultivo vegetal.

#### 1.7.2.5 Desinfestación del explante

Es necesario eliminar todos los microorganismos del tejido antes de ser cultivado, ya que éstos pueden destruir el tejido. La presencia de microorganismos en el cultivo provoca competencia metabólica por los sustratos, - lo cual afecta las condiciones del cultivo; los desinfectantes utilizados -- pueden ser etanol, hipoclorito de calcio o sodio, peróxido de hidrógeno, una vez desinfectado el tejido todas las subsecuentes manipulaciones deben realizarse en condiciones estériles.

### 1.7.3 CONTROLES DEL MEDIO AMBIENTE

#### 1.7.3.1 Condiciones nutricionales

Para el desarrollo de los cultivos, así como el funcionamiento óptimo de los mismos, es necesario que los medios de cultivo contengan cantidades adecuadas de sales de los siguientes elementos :

- a) **Micronutrientes** : están presentes en pequeñas cantidades en los vegetales y son I , B , Zn , Mn , Mo , Co , Al , Ni .
- b) **Macronutrientes** : Son esenciales para el desarrollo normal de la planta, como : C , N ,  $PO_4$  , H ,  $O_2$  , S , Ca , Mg , K , Fe .

Los macronutrientes son importantes ya que la concentración de sus iones regula la presión osmótica y el pH. Así mismo los micronutrientes ac-

túan como elementos catalíticos en las reacciones metabólicas de óxido-reducción de las plantas, su función es como cofactores de sistemas enzimáticos.

#### 1.7.3.2 Fuente de Carbono

Las fuentes de carbono que mejores resultados han dado son mono y disacáridos. Dentro de los primeros se encuentran glucosa y fructosa que dan excelentes resultados y como disacáridos es la sacarosa la representativa y -- más importante, ésta fuente es esencial para la producción de metabolitos secundarios. En estudios realizados para la producción de glucósidos cardíacos la fuente óptima es sacarosa en una concentración del 3%.

#### 1.7.3.3 Fuente de Nitrógeno

Generalmente los medios de cultivo contienen nitratos y sales de amonio, las cuales son las fuentes de nitrógeno para el crecimiento de planta dando buenos resultados por sí solas, pero la combinación de ellas da un balance adecuado para el desarrollo del cultivo de tejidos. El nitrógeno asimilado es utilizado para la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y es también importante para la producción de metabolitos secundarios.

#### 1.7.3.4 Fuente de fósforo

El fósforo es importante para la producción de ATP siendo los fosfatos la fuente típica en el cultivo de tejidos vegetales, aún los estudios realizados para la producción de metabolitos secundarios, no muestran que participen de manera importante.

#### 1.7.3.5 Vitaminas

Estas sustancias no pueden ser producidas por sí mismas en el cultivo de tejido vegetal por ello que sea importante introducirlas. Las vitaminas más utilizadas en medios de cultivo son: tiamina, ácido nicotínico, clorhidrato de piridoxina y ácido pantoténico, ya que éstos tienen la ventaja de favorecer la respuesta del explante.

#### 1.7.3.6 Reguladores de Crecimiento

Las hormonas vegetales es el término usado por los fisiólogos vegetales y la definen como una sustancia producida en estructuras a tejidos de la plan

ta la cual es transferida a otras partes para ejercer su influencia en un proceso fisiológico específico. Existen varias sustancias sintéticas, las cuales son capaces de causar o provocar efectos similares que las sustancias sintetizadas por la planta. Por ello que en la actualidad se ha preferido denominar como "regulador de crecimiento" a aquella sustancia natural sintética capaz de provocar una respuesta fisiológica y morfológica a cualquier estadio ontogénico de la planta siendo éstas: auxina, citocininas, gibberelinas, ácido abscísico y etileno.

#### AUXINAS

Las auxinas en máxima concentración se encuentran en las yemas, ápices de crecimiento de ramas, hojas y raíces.

Las auxinas estimulan el enraizamiento y formación de brotes. Las auxinas incrementan la plasticidad de la pared celular permitiendo la entrada y salida de agua; al mismo tiempo estimula la actividad enzimática. Van der Wonde (1972) evalúa que las auxinas exógenas en cultivo vegetal incrementa la síntesis y la actividad de la enzima glucano sintetasa. La elongación se produce por incremento en la permeabilidad de la célula, provocando reducción de la pared celular. El orden creciente de potencia de las auxinas es el siguiente: 2,4-D CPA ANA AIB AIA.

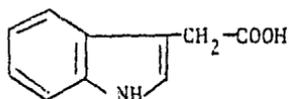
La auxina natural es el ácido indol-3-acético (AIA) (VII). Los compuestos de origen sintético con actividad de auxina son: ácido naftalenacético (NAA) (IX) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (XI), el ácido indol-3-butírico (AIB) (VIII), el ácido paraclorofenoxiacético (CPA) (X).

La relación estructural de todos éstos compuestos que poseen un núcleo insaturado plano que puede ser benceno, indol, naftaleno con una cadena lateral que posee un grupo carboxilo. Sus estructuras aparecen en la figura 7.

#### CITOCININAS

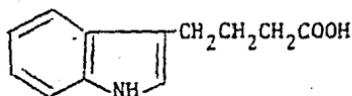
Intervienen en la multiplicación celular, además de estar involucradas en procesos de iniciación y proliferación de brotes, alargamiento y elongación celular, retardación del envejecimiento, rompimiento de la dormancia de las semillas, partenocarpia y floración. También estimulan la

FIGURA 7 ESTRUCTURAS DE ALXINAS



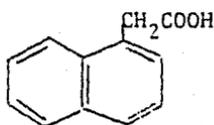
ÁCIDO INDOLACÉTICO (VII)

(A I A)



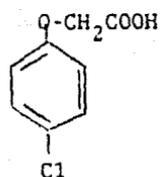
ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (VIII)

(A I B)



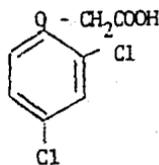
ÁCIDO NAFTALENACÉTICO (IX)

(N A A)



ÁCIDO PARAFLOROFENOXIACÉTICO (X)

(C P A)



ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (XI)

(2,4 - D)

síntesis de proteínas específicas que están involucradas en la metafase y por lo tanto dicha fase se prolonga y en consecuencia la profase no se ve afectada; esto sucede en estas etapas de la reproducción celular.

La primera sustancia aislada con esa actividad fue la cinetina -- (6 furfurilaminopurina) (XII), las citocininas poseen una estructura básica de anillo de purina, de las más conocidas son: cinetina (XII), benciladenina (BA) XIII), 6-bencilaminopurina, zeatina (XIV), y cuyas estructuras se observan en la figura 8.

#### GIBERELINAS (GA)

Estimulan el crecimiento del brote principalmente acelerando las tasas de elongación y entre las células en la región subapical del meristemo donde se están desarrollando los entrenudos jóvenes, también se les atribuye la inducción a la síntesis de enzimas hidrolíticas del tipo de las amilasas y proteasas durante la germinación de cereales.

Son diterpenos y se han aislado de hongos y plantas, hasta 1979 se conocieron 39. Los más abundantes son: GA, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>.

#### ETILENO

Lo produce la misma planta en situaciones de estrés y sus efectos son negativos. El etileno es un compuesto gaseoso, que regula el crecimiento vegetal sus efectos tóxicos sin inhibidores en su mayoría produciendo achaparramiento, hinchazón lateral de los tallos, inhibe el transporte de auxinas, causando pérdida del comportamiento geotípico normal.

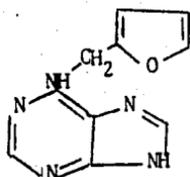
#### ACIDO ABSICICO

Se identifica en 1965, es aislado de frutos de algodón, estimula la -- abscisión, causa dormancia, acelera la caída de las hojas y del fruto, inhibe la floración de plantas inhibe la síntesis de las enzimas producidas por el GA en la germinación.

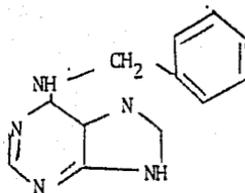
#### 1.7.3.7 PRECURSORES.

La adición de una sustancia que forma parte de la biosíntesis

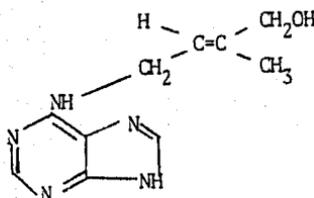
FIGURA 8 ESTRUCTURAS DE CITOCININAS



(XII)  
CINETINA



(XIII)  
BENCILADENINA



(XIV)  
ZEATINA

de un producto determinado puede ser tóxica o favorable al medio de cultivo, además de que puede incrementar la producción del metabolito secundario.

#### 1.7.3.8 Factores físicos

La luz es el factor más importante en la producción de metabolitos secundarios ya que su efecto tiene un papel importante, de lo anterior existen una gran variedad de estudios al respecto.

La temperatura en la que generalmente crecen y desarrollan bien los cultivos está en el intervalo de 25-27°C. La humedad y las condiciones atmosféricas, dependerán de las condiciones del cuarto de crecimiento de los cultivos y se recomienda que sean siempre las mismas.

### 1.8 CONTROLES BIOLÓGICOS

#### 1.8.1 Crecimiento

La actividad biosintética de los cultivos de células vegetales generalmente varía con el crecimiento y formación de productos que son esenciales para la producción de metabolitos secundarios.

Datos experimentales sobre la producción de metabolitos secundarios con respecto al tiempo (ya que se tienen pocas evidencias acerca de la interrelación entre la velocidad de formación del producto y la edad de las células individuales en el cultivo de células vegetales), indican que los patrones de producción-crecimiento pueden ser representados por los siguientes comportamientos.

- 1.- La producción ocurre paralelamente con el crecimiento celular
- 2.- La formación del producto se retrasa hasta que el crecimiento celular declina o cesa.

Con el fin de incrementar la eficiencia de producción del metabolito, se considera la posibilidad de acortar la fase "lag", que es una etapa anterior a la iniciación de la síntesis del producto, sin embargo los estudios realizados al respecto son muy pocos.

### 1.8.2 Morfogénesis de células en cultivo

En las plantas superiores, hay ciertos compuestos los cuales son sintetizados o acumulados sólo en órganos o tejidos particulares, de aquí que la diferenciación morfológica sea necesaria para la obtención de metabolitos secundarios.

La formación de estructuras especializadas se puede dividir en cuatro grupos, dichos fenómenos morfogénéticos presentan algunos problemas los cuales deben ser resueltos antes de usar estas respuestas libremente, para que sean de utilidad en las aplicaciones en que participan.

Bajo ciertas condiciones, los callos, las células en suspensión obtenidas de tejido vegetal diferenciado o algunas células aisladas de protoplastos pueden modificarse para inducir la formación de gran cantidad de raíces, brotes o estructuras semejantes a embriones (embrioides).

Los fenómenos morfogénéticos se dividen en:

- a) Formación de raíces .- Es el tipo más frecuente de morfogénesis que se puede observar en el cultivo de células. Muchos cultivos muestran formación de raíces, pero esta organogénesis es tan esporádica que no ofrece mucha esperanza para determinar las condiciones bioquímicas requeridas para la inducción de este fenómeno.
- b) Formación de brotes .- Los cultivos pueden dar origen a un número grande de plántulas las cuales pueden originarse por formación de yemas o brotes mediante el proceso de embriogénesis. La capacidad es diferente de especie a especie.
- c) Diferenciación celular.- Los estudios con cultivos de callos han llevado al conocimiento de algunos factores que son importantes para la determinación del patrón de diferenciación vascular.

Los cultivos de células vegetales ofrecen un buen material para el estudio de la diferenciación celular y de la biosíntesis de productos secunda--

rios, los estudios realizados hasta la fecha nos indican que a semejanza de lo que ocurre en la planta, el producto secundario se forma en mayor cantidad en cierta fase del ciclo celular y se ve influida frecuentemente por la relación hormonal.

### 1.8.3 Variación biosintética por productos secundarios

La variación celular es otro factor, el cual puede regular el metabolismo secundario, ya que posee un alto potencial respecto al mejoramiento de la capacidad biosintética de líneas celulares sumamente productoras de un metabolito secundario específico. Mediante el conocimiento de genética y por medio de técnicas adecuadas de selección celular, se realiza el mejoramiento de líneas celulares ya sea por :

- a) Fusión somática
- b) Transformación
- c) Mutagénesis
- d) Obtención de haploides

La implementación de dichas técnicas será de gran importancia en el campo de cultivo de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios.

### 1.8.4 INDUCCION DE TEJIDO CALOSO

Dependiendo del tejido, el callo se puede obtener de la corteza, cambium, florema secundario o xilema parenquimatoso, el único requisito que se necesita, es que el explante del cual se va a inducir callo esté previamente desinfectado para sembrarlo en condiciones estériles en un medio de cultivo sólido. El tiempo requerido de crecimiento es de 3-5 semanas, durante las cuales alcanza un tamaño adecuado para subcultivarlo, se toman pequeñas porciones del callo y se colocan en medio fresco hasta obtener la cantidad adecuada para los experimentos necesarios. La temperatura de incubación es de 25-27 °C. El efecto de la luz tendrá que ser evaluado para el caso con que se esté trabajando, ya que es específico.

### 1.8.5 Morfología y Citología

Los cultivos de callos se pueden definir como tejido que prolifera -

continuamente de manera desorganizada dando lugar a una masa amorfa de células. Dentro de esta definición entran un gran número de tipos morfológicos los cuales varían en apariencia exterior, textura y composición celular.

Algunos consisten de un tejido compacto y duro constituido por células muy pequeñas y muy juntas, mientras que otros consisten de tejido suave con mínimo contacto celular. La pigmentación del callo también es variable aún entre los callos aislados de la misma especie vegetal; muchos de ellos carecen de coloración, mientras que otros son de color verde claro (clorofila), los hay amarillos (carotenoides, flavonoides), o púrpuras, la clase y el grado de pigmentación no se ve afectado grandemente por factores nutricionales y ambientales como la exposición a la luz.

La diversidad celular que los constituyen varía de acuerdo a diferentes factores incluyendo el origen y la edad de los cultivos, así como la composición del medio. Los cultivos que crecen activamente contienen una gran proporción de células vacuoladas que se parecen al parénquima y otros grupos de células pequeñas; las células altamente vacuoladas tienen muy diversas formas que van desde esféricas hasta filamentosas. Estos cultivos contienen algunas veces tejidos que se parecen al floema, xilema, o cambium, la presencia de estos tipos de células está dirigida por la composición del medio y la edad del cultivo.

Altas concentraciones de auxina o tiempos de cultivo prolongados favorecen la formación de células parecidas a traqueidas que provocan cambios en el núcleo de las células, polipliodía y disminución del número de cromosomas, rompimiento y rearreglo son los más frecuentes, éstos suceden al incrementarse la edad del cultivo.

Como se ha podido observar el cultivo de células es muy importante hoy en día, más aún cuando es posible realizar biotransformaciones en moléculas que no es fácil sustituir por medio de reacciones químicas y que por otra parte son bastante sencillas para los microorganismos o para las células, que pueden acumularlo como un metabolito secundario.

## 1.8.6 CONSERVACION DE CELULAS VEGETALES

Para la conservación de células vegetales sin que presentes división celular, es necesario inmovilizarlas metabólicamente lo más que sea posible. Con este objetivo se han desarrollado varios métodos de acuerdo a los propósitos para los que se requiere cultivo. Los principales métodos son : conservación a temperatura de refrigeración (0-10°C), recubrimiento con aceite mineral y almacenamiento a temperaturas criogénicas. La primera técnica solo es útil para prolongar un poco el período de subcultivo que comúnmente es de 1-2 meses.

En el recubrimiento con aceite mineral el medio de cultivo se cubre con una capa de 5-40 mm de espesor. La velocidad de crecimiento en estas condiciones es constante pero mucho más lenta con respecto a las condiciones de cultivo normales.

El tercer método se basa en que la cinética de las reacciones químicas de los sistemas biológicos indican que mientras más baja es la temperatura, menor es la velocidad de reacción. Las temperaturas usadas para el almacenamiento criogénico de células son: nitrógeno líquido (-196°C) o la de vapor de nitrógeno líquido (-140°C). Estas temperaturas se usan por tres razones;

- a) La temperatura que se alcanza es adecuada para el almacenamiento prolongado de las células (1-5 años);
- b) El nitrógeno líquido y sus contenedores se encuentran comercialmente disponibles y
- c) La reactividad del nitrógeno líquido es muy baja comparada con la del oxígeno líquido.

La viabilidad de las células después del tratamiento para el almacenamiento criogénico, está influenciada por el tipo de células, naturaleza y concentración de la sustancia crioprotectora, la velocidad de congelación, velocidad de descongelación y los métodos para determinar la viabilidad celular.

### 1.8.7 OBTENCION, BIOTECNOLOGICA DE GLUCOSIDOS CARDIACOS POR CULTIVO DE CELULAS VEGETALES.

La técnica de cultivo de células vegetales se ha usado en los últimos años para la obtención biotecnológica de fármacos, ya sea por biosíntesis, que involucra la síntesis de NOVO de algún compuesto orgánico por las células del medio de cultivo, o mediante transformaciones de sustancias como los glucósidos cardíacos, usando principalmente géneros de Digitalis y menos frecuentemente de Thevetia. Estudios sobre los requerimientos nutricionales para el cultivo de D. lanata y D. purpurea indican que el hidrolizado enzimático de caseína inhibe el crecimiento el cual es mejor cuando se utiliza un medio suplementado con auxinas. Algunos investigadores mencionan el establecimiento de cultivos de callósas o células de Thevetia en suspensión, pero no detallan la técnica que usaron para ello.<sup>38,46</sup>

Varios investigadores han estudiado la síntesis de glucósidos cardíacos usando cultivos de células vegetales en los últimos años, pero otros no han sido detectados en cultivos, y en otros casos sólo se han encontrado cantidades muy pequeñas. De los estudios anteriores los que utilizan órganos diferenciados han obtenido mejores cantidades de estas sustancias<sup>19,21, 27, 45, 51.</sup>

Se han realizado estudios sobre los efectos de las auxinas en la producción de glucósidos cardíacos<sup>38</sup> con el fin de encontrar las concentraciones adecuadas de estas sustancias para la biosíntesis de los primeros. En estos, se ha encontrado que la adición de algunos precursores de los glucósidos cardíacos, unido al efecto de las auxinas, aumentan la producción, aunque algunos de dichos precursores puede resultar ser tóxico para el cultivo.<sup>38</sup>

Otros investigadores evaluaron el efecto de los cloroplastos (obtenidos por exposición del cultivo a la luz) y de algunas sustancias reguladoras del crecimiento, en tejidos de D. purpurea encontraron que los cloroplastos no son esenciales en la producción de glucósidos cardíacos usando -benciladenina (0.01 ppm), ácido naftalenacético (0.1 ppm) y ácido 2,4-diclofenoxiacético (0.01 ppm), concluyendo que eran las concentraciones óptimas de las hormonas antes mencionadas<sup>21,31</sup>

También se ha observado que la edad de los cultivos es muy importante para la producción de glucósidos cardíacos, ya que al parecer disminuye con respecto al tiempo, e inclusive puede llegar a desaparecer mientras que en otros casos puede aumentar con el tiempo si los cultivos se suplementan con algunas hormonas de crecimiento.<sup>51</sup>

## 2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En nuestro país las enfermedades cardiovasculares van en aumento día con día, según estadísticas recientes del Instituto Nacional de Cardiología. El grupo de fármacos más importante en la terapia de insuficiencia cardíaca, son los glucósidos cardíacos los cuales forman parte del cuadro básico de medicamentos del país<sup>3</sup> y su principal fuente de origen es Digitalis (planta herbácea originaria de Europa, con un alto contenido de glucósidos cardíacos); sin embargo uno de los graves problemas es el abastecimiento de estas fuentes, por las condiciones de clima, suelo, necesarias para su desarrollo y por el ataque de plagas que sufre el cultivo.

De aquí que la Biotecnología se ha enfocado a la resolución de tales problemas y en una de sus múltiples aplicaciones; como lo es la técnica de cultivo "in vitro" de tejidos vegetales, y en condiciones de laboratorio es capaz de obtener productos de interés Farmacéutico a corto plazo, por medio de la acumulación de metabolitos secundarios o la utilización de células vegetales como catalizadores enzimáticos para la realización de biotransformaciones.

Debido a que México importa la totalidad de cardiotónicos que consume, según reportes del Instituto Mexicano de Comercio Exterior (INCE)<sup>42</sup>, el presente trabajo pretende utilizar la técnica de cultivo de tejidos vegetales, para la especie Digitalis purpúrea recolectada en Huachinango, Puebla y en un principio se pretende realizar la propagación "in vitro" de sus semillas para poder obtener plántulas a partir de las cuales obtendremos tejido calloso, evaluando el efecto de la luz y balance hormonal (Auxina/Citocinina) sobre la proliferación del mismo.

En una etapa posterior se procurará que sirva de base para efectuar estudios de acumulación y/o biotransformación de glucósidos cardíacos con el fin de efectuar un estudio comparativo con el proceso de obtención de los mismos.

El primer paso para la obtención de células viables, capaces de efectuar la biotransformación de la molécula de digitoxina a digoxina mediante la introducción de un grupo OH en el carbono número 14 del núcleo esteroidal, es necesario inducir la germinación "in vitro" de semillas de ----- Digitalis purpúrea y posteriormente la proliferación del tejido caloso, obtenido éste se pasa a un cultivo en suspensión y finalmente se llega a la implementación del bioreactor vegetal, que es el responsable de que se lleve a cabo la biotransformación. Aquí sólo se plantea la posibilidad de llegar a la obtención del tejido caloso de plántulas de Digitalis purpúrea.

### 3.0. OBJETIVO

- Determinar la concentración y tipo de desinfectante en semillas de Digitalis purpúrea.
- Evaluar el efecto del balance hormonal Auxina/Citocinina en la inducción y mantenimiento de callos de Digitalis purpúrea.
- Evaluar el efecto de luz y oscuridad en la inducción de tejido calloso.

#### 4.0 H I P O T E S I S

Mediante un balance hormonal adecuado así como condiciones de ---- luz/oscuridad se obtendrán las condiciones idóneas para la producción y mantenimiento del tejido calloso en semillas germinadas de Digitalis purpúrea.

## 5.0 MATERIAL Y METODOS

## 5.1 MATERIAL

## 5.1.1. EQUIPO

Autoclave vertical marca AESA Mod. 300; 127 VCA

Campana de flujo laminar marca VECO

Balanza analítica marca BOSCH S 2000 capac. 200g Sensibilidad 0.1 mg

Refrigerador marca FRILATIC Mod. RF 200 serie 8505-334

Estufa con temperatura controlada CASA RIOS marca en trámite 127 volts

Agitador magnético MAGNESTIR

Potenciómetro CONDUCTRONIC pH 20

Agitador Vórtex SUPERMIXER 1290 LAB-LINE Instruments

Rotavapor Marca Büchi 133833

Balanza granataria OHAUS Capac. 2160 g

## 5.1.2 MATERIAL

Material de vidrio de laboratorio marca PYREX

Frascos de gerber con tapa de plástico

Bisturí / navajas X-ACTO 24

Pinzas de disección

Algodón

Gasa

Extractor Soxhlet marca PYREX

Cromatofolios Pl de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> MERCK

## 5.1.3 REACTIVOS

Cloruro de calcio dihidratado R.A. marca BAKER J.T.

Nitrato de amonio R.A. marca BAKER J.T.

Nitrato de potasio R.A. marca BAKER J.T.

Ioduro de potasio R.A. marca SCOTT REACTIVO

Cloruro de cobalto hexahidratado R.A. marca BAKER J.T.

Fosfato dibásico de potasio R.A. marca BAKER J.T.

Acido Bórico R.A. marca TECNICA QUIMICA

Tetramolibdato de amonio dihidratado RA marca BAKER J.T.

Sulfato de magnesio heptahidratado R.A. BAKER J.T.  
Sulfato de manganeso tetrahidratado R.A. BAKER J.T.  
Sulfato de cobre pentahidratado R.A. BAKER J.T.  
Sulfato de Zinc heptahidratado R.A. BAKER J.T.  
Sulfato ferroso heptahidratado R.A. BAKER J.T.  
Etilendiamintetracetato de sodio R.A. BAKER J.T.  
Glicina R.A. MERCK  
Acido nicotínico R.A. SIGMA CHEM  
Mio-inositol R.A. MERCK  
Clorhidrato de piridoxina R.A. MERCK 7527  
Clorhidrato de tiamina R.A. MERCK 7527  
Agar libre de inhibidores MERCK  
Acido tricloroacético R.A. MERCK  
Cloramina T SIGMA CHEM  
Hidróxido de sodio R.A. BAKER J.T.  
Acido clorhídrico concentrado BAKER J.T.  
Acido sulfúrico concentrado R.A. TECNICA QUIMICA  
Hipoclorito de sodio comercial "CLORALEX"  
Peróxido de hidrógeno 30% R.A. MERCK  
Sales cuaternarias de amonio SIBRON

## 5.2. METODOS

## 5.2.1. RECOLECCION DE MATERIAL BIOLÓGICO

Las semillas utilizadas se recolectan en Huauchinango, Puebla, en el Km. 37 de la carretera Tulancingo-Poza Rica sobre el puente Totolapa en junio de 1984.

## 5.2.2. PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio del cultivo que se emplea es el de Murashigue y Skoog (1962), suplementado con vitaminas, la preparación del mismo es el siguiente:

SOLUCION	CONCENTRACION (g/100 ml)
A: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4
B: $\text{NH}_4\text{NO}_3$	16.5
$\text{KNO}_3$	19.0
C: KI	0.0083
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.00025
D: $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.7
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.062
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0025
E: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.223
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.086
F: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.278
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	0.373
VITAMINAS *	
G: Glicina	0.020
Ac. nicotínico	0.025
Mio-inositol	1.0
H: Clorhidrato piridoxina	0.005
Clorhidrato de tiamina	0.010

\* Concentraciones propuestas por Hagimori<sup>22</sup> (1980) para cultivo de *Digitalis*.

## PROCEDIMIENTO

Se pesan todos los componentes, se disuelven en agua destilada y -- desionizada. Se transfiere a un matraz volumétrico y se afora a un litro.

La solución F se prepara de la siguiente forma: se disuelve primera-- mente el EDTA, en agua caliente y se mantiene en agitación constante, poste-- riormente se adiciona lentamente el sulfato ferroso hasta que la solución -- tome una coloración amarillo cristalina y se deja a ebullición por unos minu-- tos hasta la completa formación del complejo. En caso de que la solución sea turbia o si existe un precipitado, se recomienda volver a prepararse..

Los reguladores de crecimiento empleados fueron 2,4-D y cinetina.

Auxina: Pesar 10 mg del ácido 2,4-D y disolverlo en un volumen de -- 10 ml de una solución de alcohol al 30% v/v. Pasar la solución a un matraz aforado de 50 ml. y llevar al volumen con la misma mezcla. La concentración final es de 200 mg/l.

Citocinina: Pesar 10 mg de cinetina y disolverla en la mínima canti-- dad de ácido clorhídrico 0.5N, con ligero calentamiento. Dejar enfriar la - solución y pasarla a un matraz aforada de 50 ml. Llevar al aforo con agua - destilada y desionizada. La concentración final es de 200 mg/l.

Las soluciones deben mantenerse en refrigeración a excepción de la so-- lución B y E, ya que debido a su alta concentración precipitan a bajas tempe-- raturas. Las soluciones de hormonas deben usarse recién preparadas aunque - pueden prepararse cada quince días, debido a que éstas se descomponen cuando son almacenadas por tiempos prolongados. Las soluciones G Y H (vitaminas) , se preparan cada 20 días éstas se conservan por poco tiempo cuando están en solución y son susceptibles a contaminación microbiana.

De las soluciones anteriormente mencionadas se tomaron los siguientes volúmenes para preparar un litro de medio:

Solución	A	10 ml
	B	1 ml
	C	10 ml
	D	1 ml
	E	1 ml
	F	10 ml
	G	10 ml
	H	10 ml

- Se colocan aproximadamente 800 ml de agua destilada y desionizada en un matraz de un litro, después se adicionan los volúmenes antes mencionados, -- así como la solución de hormonas, posteriormente se adicionan 30 g de azúcar y se ajusta a pH 5.4 a 5.8.
- Se adiciona el agar en concentración 0.6% con agitación continua para evitar la formación de grumos.
- Se completa a 1000 ml y se disuelve el agar por calentamiento.
- El medio se vacía con una probeta 20 ml de medio a cada frasco de gerber.
- Tapar el frasco y esterilizar a 115°C (15 lbs) por 15 minutos.

### 5.2.3. PROCESO DE DESINFESTACION DE SEMILLAS Y PLANTULAS\*

- Las semillas se colocan en un frasco con tapón de baquelita (éstas deben estar libres de residuos de hoja y paja).
- Se les adiciona solución de etanol al 70% y se dejan reposar durante 20 segundos.
- Se enjuagan con agua estéril dos veces, ésto se logra mediante la extracción de la misma con una jeringa estéril.
- Las semillas son sometidas al desinfectante (hipoclorito de sodio dil 1:5 durante 10 minutos de exposición).
- Se enjuagan tres o cuatro veces con agua destilada estéril.
- Se extrae la mayor cantidad de agua para dejar las semillas lo mas secas posible.

### 5.2.4. PROCESO DE SIEMBRA DE LAS SEMILLAS.

- Se toman las semillas con unas pinzas, evitando arrastrar agua.
- Con las pinzas se toman unas pocas semillas y se esparcen sobre el medio.
- Las bocas de los frascos son flameados\*\* y se tapan.
- Después de que se ha tapado el frasco, el contorno de la tapa se cubre con papel Parafilm.

NOTA: Todas las manipulaciones se realizan en condiciones de asepsia, para lo cual se requiere de un cuarto aséptico, campana de flujo laminar, gorro, guantes, bata blanca y cubrebocas, todo el material (utilizado debe esterilizarse, ya sea por calor seco o calor húmedo, según sea el caso.

\* Para las plántulas se sigue el mismo procedimiento, estas se obtienen germinando a las semillas sobre un algodón húmedo sin condiciones de asepsia.

\*\* Cada vez que se tomen semillas y/o se depositen en el medio las bocas de los frascos deben flamearse.

### 5.2.5. PARA LA INDUCCION DE CALLO

- En la campana de flujo laminar y condiciones estériles al hipocotilo que se obtiene a los 12 días de haberse puesto a germinar las semillas, se le toma con la pinza estéril y fría.
- Se coloca en una caja de petri que contiene un disco de papel filtro estéril.
- Con el bisturí estéril se realiza el corte; en el cual solo se elimina una porción de raíz.
- El explante se deposita en el medio en forma horizontal como lo muestra el siguiente esquema:



- Posteriormente el frasco se flamea, se tapa y éste se cubre con papel Para film.

### 5.2.6. INCUBACION

Para la germinación las condiciones de incubación son las siguientes:

- a) Temperatura de incubación  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- b) Condiciones de luz: Luz continua (24 horas)
- c) Período de incubación: 9 a 12 días

Para la inducción de tejido callosó:

- a) Temperatura de incubación:  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

## b) Condiciones de luz:

- Luz continua (24 horas)
- Oscuridad (24 horas)
- Fotoperiodo (16 horas luz / 8 horas oscuridad)

## 5.2.7. PARAMETROS DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CALLOSO

## 5.2.7.1. EVALUACION DE PESO FRESCO.

- Se toma el frasco con el tejido cultivado a las cuatro semanas.
- Se extrae el callo con unas pinzas estériles y se coloca sobre el papel -- glassine previamente pesado.
- El callo se pesa en balanza analítica.
- Determinar el índice de peso fresco mediante la siguiente fórmula:

$$IPF = \frac{PFF - PFI^*}{PFI}$$

Donde:

PFF= Peso del callo después de cuatro semanas de incubación.

PFI= Peso del explante inicial (hipocotilo)

IPF= Índice de peso fresco

El PFI se determina pesando al hipocotilo de la misma forma como se hizo con el callo. (sólo que se hicieron varias determinaciones y se obtuvo un estándar de peso por lo difícil de su manipulación en condiciones estériles).

## 5.2.7.2. EVALUACION DE PESO SECO

- El callo se extrae del frasco después de cuatro semanas.
- Se coloca en un pesafiltro a peso constante.
- El pesafiltro se coloca en una de las tapas de la caja de petri.

- Se introduce a la estufa durante 24 horas a una temperatura de 60°C.
- Después de éste tiempo se saca, se deja enfriar y se pesa.
- El índice de peso seco se determina por diferencia.

$$\text{IPS} = \frac{\text{PCI} - \text{PMF}}{\text{PCI}}$$

Donde:

PCI= Peso del callo inicialmente

PMF= Peso del callo seco

IPS= Índice del peso seco.

#### 5.2.7.3. DISPERSABILIDAD CELULAR

- Para realizar esta determinación se toma el callo y se deposita en un tubo de ensayo que contiene 5 ml de agua destilada estéril.
- Posteriormente se introduce una barra magnética de 0.5 cm de longitud
- Se agita por diez minutos y se observa si hay total dispersión del callo

#### 5.2.8. EXTRACCION DE GLUCOSIDOS CARDIACOS DE PLANTULAS Y TEJIDO CALOSO.

- Se toma aproximadamente 1 g de tejido
- Se macera con 5 ml de una mezcla cloroformo:metanol (1:1) en el homogenizador.
- Se agita posteriormente durante 2 horas en un agitador magnético.
- El extracto se concentra casi a sequedad a una temperatura no mayor de 60°C

NOTA: Se trabaja tejido fresco y tejido seco y pulverizado. (la temperatura de secado no debe superar los 60°C)

### 5.3 METODOS DE IDENTIFICACION DE LOS GLUCOSIDOS CARDIACOS.

#### CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

- Se utilizan placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub><sup>MERCK</sup>
- El sistema de elución que se utilizó fué una mezcla cloroformo:etanol (9:1)
- Como revelador se utilizó ácido sulfúrico concentrado y mezcla cloramina T(1%) - ácido Tricloroacético (25%) en proporción (8:2)
- Se utilizan como estándares de referencia digoxina y digitoxina.

### 5.4 RESIEMBRA

- Después de cuatro semanas de haber inducido el tejido calloso, se resiembraba en las mismas condiciones asépticas de la siguiente forma:
  - El tejido calloso se toma con pinza estéril.
  - Se coloca sobre una caja de petri que contiene un disco de papel filtro estéril.
  - Con el bisturí se realizan varios cortes transversales.
  - Cada corte se deposita en medio nuevo, con la concentración hormonal en que fué inducido.

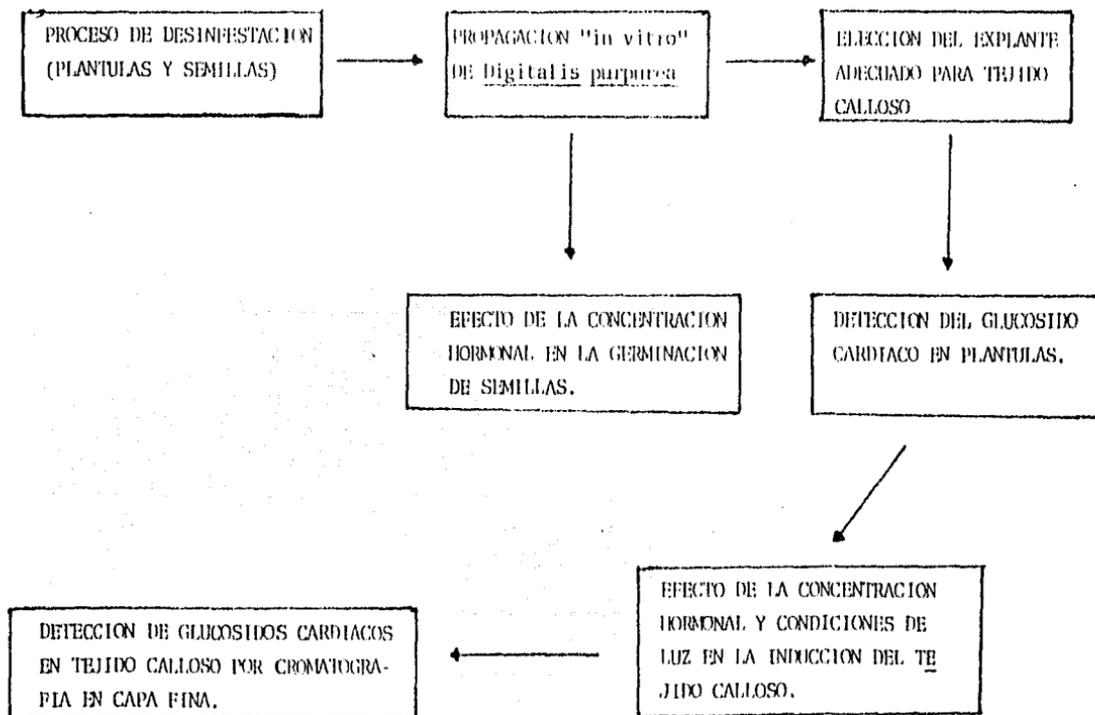
### 6.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la figura 10 se encuentra de manera esquematizada el desarrollo experimental, que siguió el presente trabajo de investigación.

### 6.1 EVALUACION DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS DE Digitalis purpurea

Se cuentan 100 semillas y se depositan en un frasco que contiene un algodón húmedo, se ponen a germinar y se observa el número de plántulas obtenidas y se calcula el porcentaje obtenido.

FIGURA 10. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## 6.2 GERMINACION DE LAS SEMILLAS.

- a) Medio no controlado.- Las semillas se ponen a germinar sobre un algodón húmedo cubierto por una bolsa de plástico.
- b) Medio controlado.- Las semillas se ponen sobre medio basal Murashigue y -- Skoog, después se someten a balance hormonal, evaluando el efecto auxina/citocinina en la germinación de las mismas.

## 6.3. ELECCION DEL TIPO Y CONCENTRACION DEL DESINFESTANTE.

La metodología de desinfestación es la misma tanto para semillas como para plántulas, obtenidas de cultivo no controlado.

Los desinfestantes probados fueron:

- Hipoclorito de sodio a las siguientes diluciones: 1:2, 1:4, 1:5,
- Sales cuaternarias de amonio al 0.2% y 0.5%
- Peróxido de hidrógeno al 30% , los tiempos probados para los agentes desinfectantes es 10 y 15 minutos.

## 6.4 ELECCION DEL EXPLANTE PARA LA INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO.

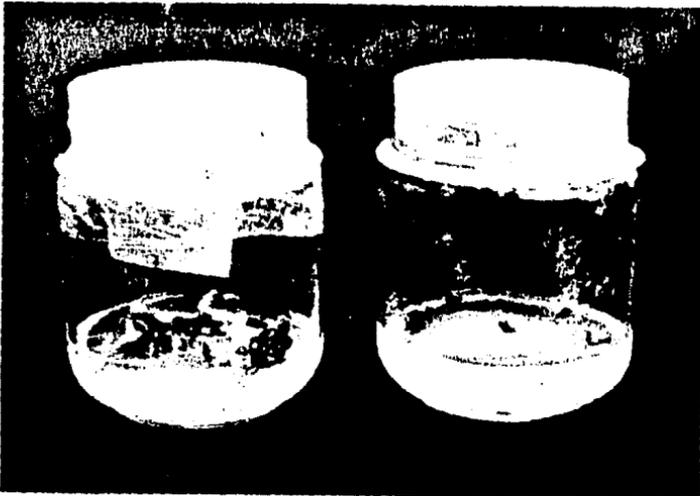
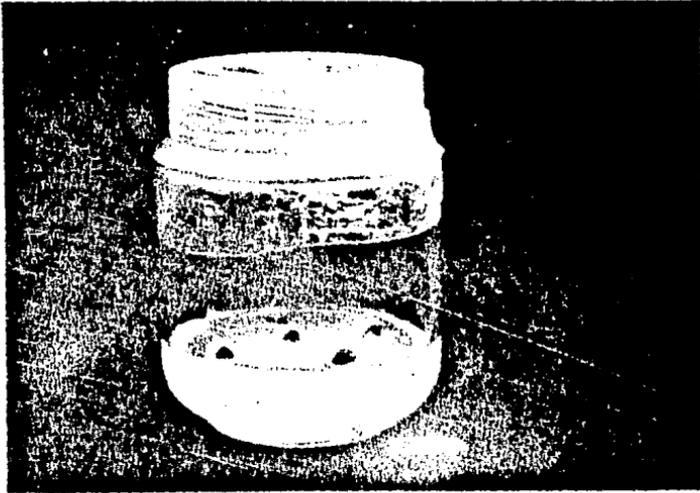
Los explantes probados fueron raíz, tallo, hoja de plántula de 7 semanas de edad e hipocotilo de 9 días. Las plántulas se obtuvieron en medio basal de Murashigue y Skoog ya que de esta forma se tiene un explante homogéneo.

Los cortes que se realizan son los siguientes; figura 11

- a) Plántula (raíz, tallo, hoja)
- b) Hipocotilo (se elimina una porción de la raíz)

FIGURA 9.

TEJIDO CALLOSO DE Digitalis purpurea



6.5 EFECTO DEL BALANCE HORMONAL (ácido 2,4 - diclorofenoxiacético, ácido indolacético./ cinetina) Y FOTOCOCONDICIONES (luz, oscuridad, fotoperíodo) RESPECTO A LA INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO.

El explante elegido del experimento anterior se somete a balance hormonal auxina/citocinina, probando el ácido 2,4-D/Cinet. y AIA/Cinet, de acuerdo con la matriz experimental de la fig. 12. Posteriormente se prueba al ácido indolacético, reduciendo a una matriz de 2x3 con el fin de encontrar la relación hormonal que dá mejor respuesta al tejido calloso.

6.6 IMPLEMENTACION DEL PROCESO DE EXTRACCION DE LOS GLUCOSIDOS CARDIACOS A PARTIR DE PLANTULAS Y TEJIDO CALLOSO.

En la fig. 13 se muestra los dos procesos evaluados con el fin de establecer cual era el más adecuado para extracción del cardiotónico, en ambas fuentes.

FIGURA 11

ELECCION DEL EXPLANTE ADECUADO PARA INDUCIR CALLO

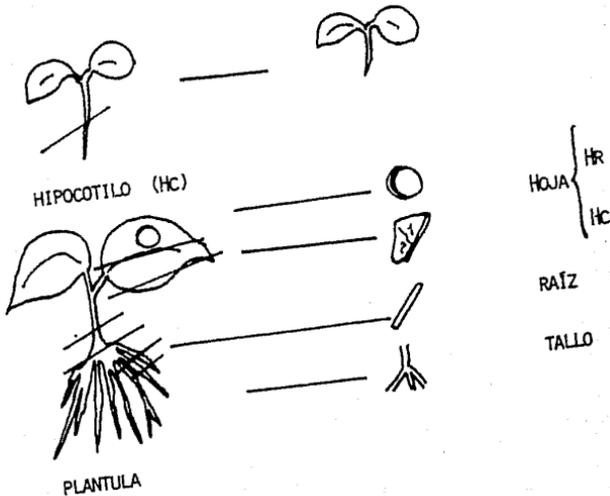


FIGURA 12.

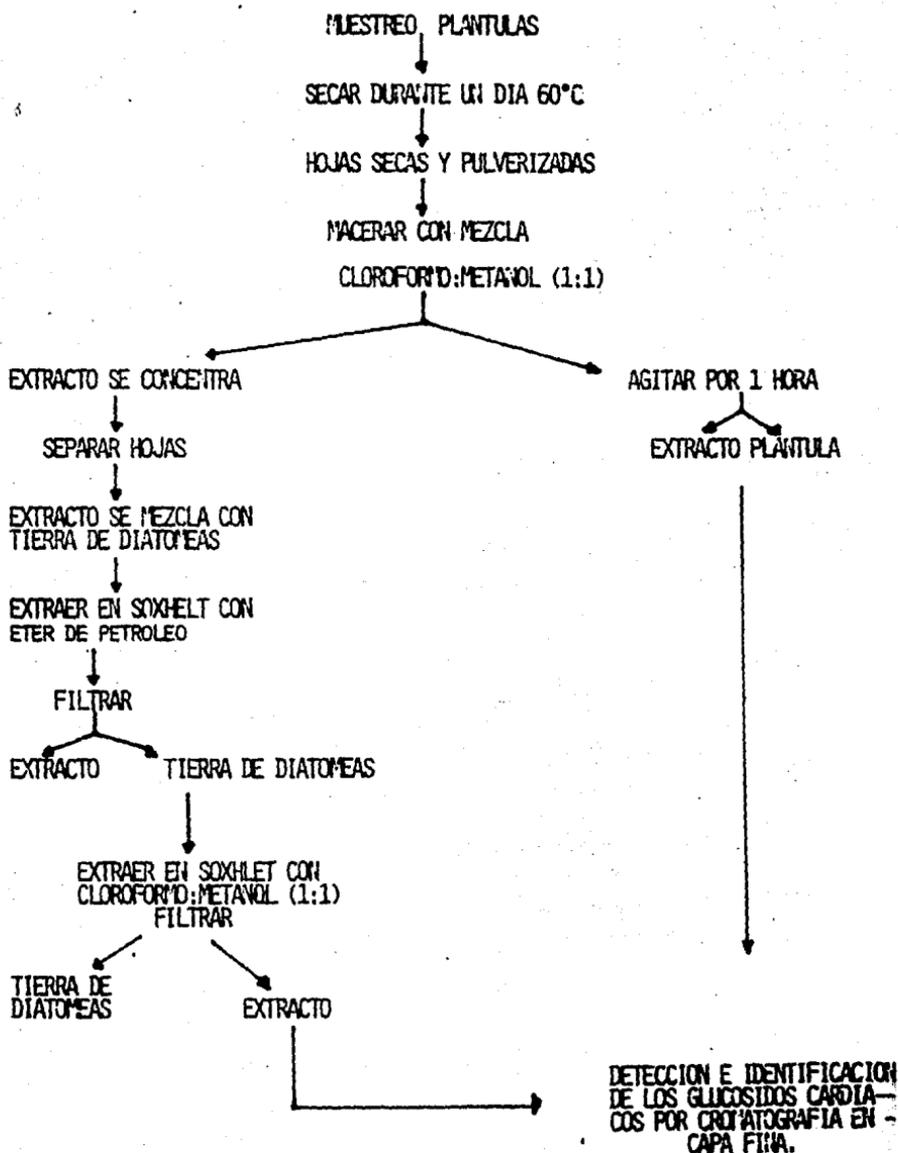
## MATRIZ EXPERIMENTAL

		ACIDO 2,4 DICLOROFENOXIACETICO ( mg/l )			
		0	1	3	5
C I N E T I N A  (mg/l)	0	1*	2	3	4
	0.1	5	6	7	8
	0.5	9	10	11	12
	1.0	13	14	15	16
	2.0	17	18	19	20

\* SE REFIERE AL NUMERO DE TRATAMIENTO

FIGURA 13.

PROCESO DE EXTRACCION DE LOS GLUCOSIDOS CARDIACOS



## 7.0 RESULTADOS Y DISCUSION

Las semillas utilizadas en este experimento fueron re-colectadas en Huauchinango, Puebla. Fué necesario evaluar el porcentaje de viabilidad de las semillas y este es del 80% y - el tiempo requerido para obtener el explante adecuado es de - 9 a 12 días.

### 7.1 GERMINACION NO CONTROLADA

Las semillas germinan en un período de 15 días sobre algodón húmedo, las plántulas obtenidas se sometieron al proceso de desinfección y los resultados se encuentran en la tabla - III. La tabla muestra el porcentaje de contaminación a las dos semanas después de incubarse a 28°C en luz continua y oscuridad, aún después de seis semanas las plántulas no dan respuesta.

En cuanto a los desinfectantes probados, se observa que el menor porcentaje de contaminación se obtiene con el peróxido de hidrógeno, pero necrosa al tejido, aunque también con hipoclorito de sodio los porcentajes son menores del 50% no se seleccionó a ninguno puesto que las plántulas no dan respuesta, ahora en la germinación controlada se trabaja con las semillas que al parecer resisten más el tratamiento.

TABLA III. PORCIENTO DE CONTAMINACION DESPUES DE 2 SEMANAS DE INCUBACION A 28°C, EN LUZ CONTINUA EN PLANTULAS: ---

D. purpurea

DESINFESTANTE	CONCENTRACION		TIEMPO DE EXPOSICION	
			10min.	15min.
		dilu-- ción.		
	5.65%	1:2	40%	20
HIPOCLORITO DE SODIO	"	1:4	40%	40
	"	1:5	40%	40
	clave 912	0.3%	40	40
SALES DE AMONIO	(S/N)*		60	60
	(S/N)	0.5%	40	60
	912		60	40
PEROXIDO DE HIDROGENO	30%		18	

\*Esta sal de amonio no posee clave

## 7.2 GERMINACION CONTROLADA

Los desinfectantes probados para las semillas fueron los que se muestran en la tabla IV, de los cuales se eligió al hipoclorito de sodio -- con una dilución 1:5 y con un tiempo de exposición de 10 min. Nuevamente el hipoclorito y el peróxido son los que dan mejores resultados, aunque no podemos dejar de mencionar a la sal de amonio clave 912, que también disminuye la contaminación de las semillas en el medio. Se elige al hipoclorito por varias causas, las ventajas y desventajas de los desinfectantes probados se muestran en la tabla V. De lo anterior podemos decir que se prefiere trabajar con las semillas que se obtienen de germinación controlada, porque las plántulas que se obtienen están libres de microorganismos y las semillas -- resisten más al proceso de desinfección.

## 7.3 EFECTO DEL BALANCE HORMONAL EN LA GERMINACION

En la germinación controlada de semillas de Digitalis purpurea se pudo evaluar que el efecto proporcionado por el balance hormonal da resultados muy heterogéneos y no atribuibles a un efecto específico de las hormonas evaluadas, presentando en algunos casos plántulas pequeñas con hojas grandes o con hojas pequeñas, que en ocasiones presentaban un color amarillento, por lo que se decidió obtener los explantes en un medio controlado en ausencia de hormonas.

## 7.4 ELECCION DEL EXPLANTE MAS ADECUADO PARA INDUCIR CALLO

Para elegir el explante más adecuado se utilizaron plántulas de 9 días y de 7 semanas de edad. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VI, en la cual se observa que todos los explantes inducen -- callo a diferentes tiempos a excepción del tallo que regenera la planta.

De los cortes realizados se eligió el hipocotilo (Hc), ya que induce el tejido calloso a la segunda semana y no promueve diferenciación, sin embargo presenta la desventaja que para obtener la raíz, se requiere de 7 semanas y para el Hc de 9 días. En relación a las investigaciones realizadas --

TABLA IV. PORCIENTO DE CONTAMINACION DESPUES DE 2 SEMANAS DE INCUBACION A 28°C EN LUZ CONTINUA PARA SEMILLAS DE D. purpurea

DESINFESTANTE	CONCENTRACION.	DILUACION.	TIEMPO DE EXPOSICION.		PERIODO DE GERMINACION.
			10min.	15min.	
HIPOCLORITO DE SODIO	5.65%	1:2	40	-	9 días
	"	1:4	-	-	
	"	1:5	-	-	
SALES DE AMONIO	clave 912	0.3%	20	20	20 días
	S/N		40	40	
	912	0.5%	-	-	
	S/N		40	40	
PEROXIDO DE HIDROGENO	30%		-	-	30 días *

\* Las semillas oscurecen (se oxidan)

TABLA V. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS AGENTES DESINFESTANTES  
PROBADOS PARA D. purpurea

DESINFESTANTE	VENTAJAS	DESVENTAJAS
HIPOCLORITO DE SODIO *	TIEMPO DE EXPOSICION CORTO. SEMILLAS GERMINAN EN 9 DIAS. LAS DILUCIONES NO -- AFECTAN BARATO	NINGUNA
PEROXIDO DE HIDROGENO	NO HAY CONTAMINACION TIEMPO DE EXPOSICION CORTO.	OXIDA LAS - SEMILLAS. GERMINAN DES PUES DE 30 - DIAS.
SALES DE AMONIO	NO HAY OXIDACION APRE CIABLE. CONCENTRACION 0.5% -- DISMINUYE LA CONTAMI- CION.	SON CARAS. CONCENTRACIO NES ALTAS. GERMINAN A - A LOS 20 --- DIAS.

\* Elegido para la desinfestación de las semillas.

TABLA VI. ELECCION DEL EXPLANTE MAS ADECUADO EN LA INDUCCION DE TEJIDO CALOSO DE *D. purpurea*, INCUBADO EN LUZ Y OSCURIDAD A 28°C.

## EXPLANTE

TIEMPO DE INDUCCION SEMANAS	PLANTULA			HIPOCOTILO		
	RAIZ	TALLO	HOJA			
			<table border="1"> <tr> <td>corte redondo.</td> <td>corte cuadrado.</td> </tr> </table>	corte redondo.	corte cuadrado.	
corte redondo.	corte cuadrado.					
1	-	Reg	-	-		
2	callo	Reg	-	callo		
3	"	Reg	-	"		
4	"	Reg	-	"		
5	"	callo	callo	"		
6	"	"	" callo	"		

por Vogel (1981), el cual observa que al trabajar con cultivos diferenciados tanto de brotes como raíz; el contenido mayor de glucósidos cardíacos se encontró en el cultivo de brotes y en el de raíz sólo - había trazas de ellos.<sup>58</sup>

## 7.5 PARAMETROS DE CRECIMIENTO

### 7.5.1 EVALUACION DE PESO SECO

Respecto a éste parámetro los resultados se encuentran en las tablas VII y VIII, en las cuales se encontró que sí hay efecto del balance hormonal y de fotocondiciones. Tratando de representar los resultados obtenidos de tal forma que se aprecie claramente el efecto de la relación hormonal, en la fig. 14, se puede observar que existe una interrelación del balance hormonal respecto a peso seco. En el rango evaluado se logró establecer máximos de respuesta en las relaciones hormonales: 3.0/0.0; 3.0/0.1; 3.0/0.5; 3.0/1.0; 1.0/2.0 de donde se elige el 3.0/0.0 para oscuridad. Para luz los valores de 1.0/0.0; 1.0/1.0; 1.0/2.0 y 5.0/2.0 muestran un comportamiento cíclico por lo que no resulta predecible, sin embargo el máximo crecimiento se tiene en la relación hormonal 1.0/1.0

Por otro lado conviene mencionar que el efecto proporcionado por la cinetina en ausencia de auxinano induce tejido caloso, sino que regenera la planta.

### 7.5.2 EVALUACION DE PESO FRESCO

En éste parámetro también se observa que existe efecto por balance hormonal y fotocondiciones, encontrándose exactamente las mismas relaciones hormonales que dan máximo crecimiento celular en peso seco y cuyos resultados están en las tablas IX y X. En este punto cabe mencionar que los callos obtenidos tienen un alto contenido de agua, todos los valores oscilan entre el 90 y 95% con respecto a su peso.

### 7.5.3 CURVA DE CRECIMIENTO

De la matriz experimental probada, se seleccionó el mejor índice de peso seco, incubado en luz para evaluar su curva de crecimiento,

TABLA VII. INDICE DE PESO SECO PARA CALLOS DE D. purpurea A LAS 4 SEMANAS INCUBADOS EN OSCURIDAD A 28°C.

		ACIDO 2,4-D (mg/l)			
		0	1	3	5
C I N E T I N A (mg/l)	0	*	0.04787	0.1266	0.0965
	0.1	*	0.0525	0.1116	0.0682
	0.5	*	0.0699	0.0814	0.0190
	1	*	0.0784	0.0776	0.08164
	2	*	0.1063	0.0940	0.0917

\* El explante se regenera

TABLA VIII. INDICE DE PESO SECO PARA CALLOS DE D. purpurea A LAS 4 SEMANAS INCUBADOS EN LUZ CONTINUA A 28°C.

		ACIDO 2,4-D (mg/l)			
		0	1	3	5
C I N E T I N A (mg/l)	0	*	0.0956	0.0610	0.0459
	0.1	*	0.0328	0.0289	0.0300
	0.5	*	0.0332	0.0400	0.0164
	1	*	0.1017	0.0760	0.04955
	2	*	0.1007	0.0585	0.0960

\* No induce callo, el explante se regenera.

FIGURA 14. INTERRELACION DE BALANCE HORMONAL AUXINA/CITOCININA CON RESPECTO A PESO SECO.

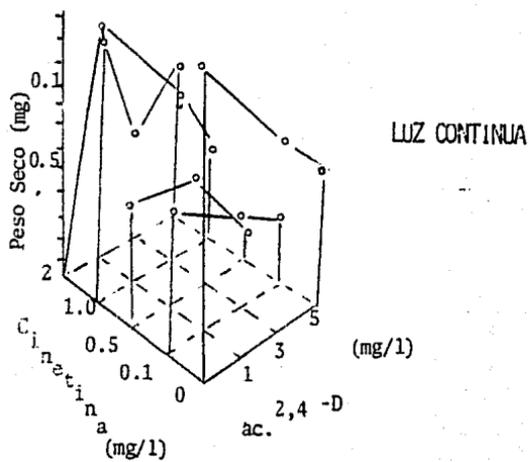
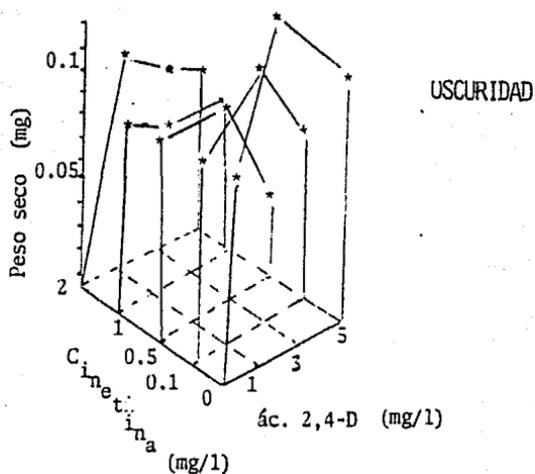


TABLA IX. INDICE PESO FRESCO PARA CALLOS DE D. purpurea A LAS 4 SEMANAS INCUBADOS EN LUZ CONTINUA A 28°C

		ACIDO 2,4-D (mg/l)			
		LUZ CONTINUA			
		0	1	3	5
C I N E T I N A	0	*	0.9910	0.6877	0.5216
	0.1	*	0.4102	0.3528	0.3160
	0.5	*	0.3894	0.4881	0.2155
	1	*	1.2090	0.8763	0.5744
	2	*	0.9970	0.7418	1.0392

(mg/l)

TABLA X. INDICE PESO FRESCO PARA CALLOS DE D. purpurea A LAS 4 SEMANAS INCUBADOS EN OSCURIDAD A 28°C

		ACIDO 2,4-D (mg/l)			
		OSCURIDAD			
		0	1	3	5
C I N E T I N A	0	*	0.5313	1.4071	1.1098
	0.1	*	0.6648	1.2135	0.7186
	0.5	*	0.7780	0.9400	0.2651
	1	*	0.8243	0.9887	1.1592
	2	*	1.1197	1.1586	1.0671

(mg/l)

la cual se muestra en la fig. 15 y de la cual se puede decir que a las cuatro semanas se obtiene el máximo crecimiento del callo, ya que después de este tiempo el tejido tiende a perder agua y deshidratarse, es por esto que se decide reseñar en este tiempo y no a las 6 u 8 semanas.

El comportamiento seguido por las células vegetales se asemeja al de microorganismos con la diferencia de que el crecimiento vegetal es muy lento, se sabe que el tiempo de 30 a 60 horas<sup>59</sup>, por lo que el tiempo recomendado para la toma de muestras es de cada dos semanas, se gon se recomienda en varias publicaciones.<sup>59</sup>

#### 7.6 EFECTO DEL BALANCE HORMONAL EN LA INDUCCION DEL CALLO

Los resultados obtenidos en esta fase se presentan en las tablas XI y XII encontrándose que cuando se utiliza únicamente cinetina no se induce el tejido calloso y si la regeneración de la plántula, mientras que para concentraciones de auxina sola, así como la combinación con cinetina se obtiene tejido calloso. En este caso el explante utilizado es el hipocotilo, evaluando también el efecto de la luz en la inducción del mismo.

#### 7.7 EFECTO DEL FOTOPERIODO EN LA INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO

Después de haber comprobado que la luz tiene un efecto importante se decide trabajar con una matriz de 2X3 con el ácido 2,4-D / cinetina y una matriz de 4X5 de AIA / cinetina, en fotoperiodo (16 horas luz/ 8 horas oscuridad). En la tabla XIII se presentan los resultados, encontrándose que se logra mayor inducción en las relaciones hormonales : 3.0/0.5; 5.0/0.5; 5.0/1.0 para ácido 2,4-D/cinetina.

Por lo que respecta a la matriz con ácido AIA, los resultados se muestran en la tabla XIV, observando que se presenta un mayor porcentaje de inducción en las concentraciones 3.0 / 2.0 y 5.0/2.0 para AIA/cinetina. Sin embargo el AIA induce el callo más fácilmente que ácido 2,4-D, tal aseveración es en base al tiempo que tarda en inducirlo y el cual es para ác. 2,4-D de 16 a 20 días y para AIA de 8 a 10 días.

FIGURA 15. CURVA DE CRECIMIENTO PARA HIPOCOTILO CON BALANCE HORMONAL 1.0/1.0 (mg/l) DE ACIDO 2,4-D/CINETINA INCUBADOS A 28°C - EN LUZ CONTINUA

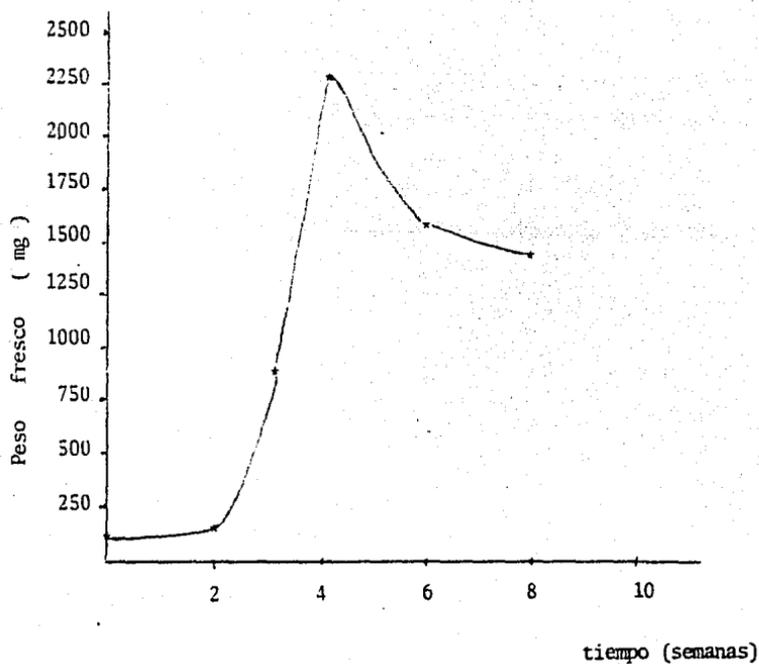


TABLA XI. PORCIENTO DE INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO (%) A LAS 2 SEMANAS INCUBADOS A 28°C EN LUZ CONTINUA

Acido 2,4 D (mg/l)

	mg/l	0	1	3	5
C I N E T I N A  (mg/l)	0	*	100	100	100
	0.1	*	100	100	100
	0.5	*	100	100	100
	1	*	100	100	100
	2	*	100	100	100

TABLA XII. PORCIENTO DE INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO (%) A LAS 2 SEMANAS INCUBADOS A 28°C EN OSCURIDAD

Acido 2,4-D (mg/l)

	mg/l	0	1	3	5
C I N E T I N A  (mg/l)	0	*	100	100	100
	0.1	*	100	-	100
	0.5	*	100	100	100
	1	*	100	100	100
	2	*	100	100	100

TABLA XIII. PORCIENTO DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO A LAS  
2 SEMANAS A 28°C EN FOTOPERIODO PARA AC. 2,4-D/CINETINA.

		AC. 2,4-D (mg/l)	
		5	5
CINETINA	0	90 %	80 %
	0.5	100 % *	100 % *
	1.0	90 %	100 %

(mg/l) (apariencia) \*color café

TABLA XIV. PORCIENTO DE INDUCCION DE TEJIDO CALOSO A LAS -  
2 SEMANAS A 28°C EN FOTOPERIODO PARA AIA/CINETINA.

		AC. INDOLACETICO (mg/l)			
		0	1	3	5
C I N E T I N A  (mg/l)	0	*	20	60	60
	0.1	*	35	--	70
	0.5	*	15	95	90
	1	*	20	50	80
	2	*	20	100	100

## 7.8 EVALUACION DEL PORCIENTO DE DIFERENCIACION

Considerando como diferenciación la formación de brotes, raíces u hojas presentes en el tejido, de la matriz experimental evaluada para fotoperíodo la tabla XV, se refiere al porciento de diferenciación de callos de D. purpurea, encontrando que el balance 5.0 /0.0 de AIA /ci netina presenta una mayor diferenciación, con respecto a la matriz - evaluada para el ácido 2,4\_D donde se puede observar que el callo per manece indiferenciado.

Tomando en cuenta lo anterior, se decide elegir al ácido 2,4-D -- como hormona más adecuada para inducir el tejido calloso, ya que man-- tiene al tejido calloso indiferenciado tanto en fotoperíodo como en -- luz y oscuridad a pesar de requerir un período más largo en la induc-- ción del mismo.

## 7.9 DISGREGACION CELULAR

Este parámetro es importante para el paso de células del medio - sólido a un cultivo en suspensión , éste parámetro se evalua cualita-- tivamente observándose que el callo obtenido de hipocotilo es el más friable por la facilidad de dispersión de sus células en una solu---- ción acuosa. Los callos obtenidos de raíz también son friables a di-- ferencia de los que se obtienen de hoja.

Como estos resultados solo fueron cualitativos no se pudieron ta-- bular, solamente se estimó que se requiere de un lapso de diez minutos para dispersar el callo de hipocotilo y raíz. La dispersabilidad ce lular fué adecuada para las matrices experimentales probadas.

## 8.0 DETECCION DE GLUCOSIDOS CARDIACOS

La mezcla de glucósidos cardíacos se evaluó por medio de cromato-- grafía en capa fina, tanto para plántula como para callo a diferentes edades como se observa en los resultados de la tabla XVI.

Sin embargo en tejido calloso los glucósidos no se pudieron detec-- tar por éste método y se considera necesario usar un método mas sensible.

TABLA XV. PORCIENTO DE DIFERENCIACION PARA CALLOS DE  
D. purpurea A LAS 4 SEMANAS.

		Ac. IIA	
		3	5
CINETINA	0	30 %	10%
	0.5	0%	10%
	1.0	0%	40%

PARA EL ÁC. 2,4-D NO HAY DIFERENCIACIÓN.

TABLA XVI. DETECCION DE GLUCOSIDOS CARDIACOS TANTO EN PLANTULA  
COMO EN CALLO, A. DIFERENTES EDADES.

<u>PLANTULA</u>	<u>TIEMPO (SEMANAS)</u>	<u>CARDIOTONICO</u>
	2	-
	4	-
	7	+
	10	+
	12	+
	14	+
<u>CALLO</u>	2	-
	4	-
	6	-
	8	-

(FASE MOVIL CLOROFORMO:ETANOL (9:1) (-) AUSENCIA: (+) PRESENCIA)

## 9.0 CONDICIONES MAS ADECUADAS PARA LA INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO

En la tabla XVII, se pueden observar las condiciones más adecuadas para la inducción de tejido calloso de explantes de Digitalis----- Dichas condiciones son el resultado de la recopilación de todos los parámetros evaluados así como la condiciones en que se llevaron a cabo.

TABLA XVII. CONDICIONES MAS ADECUADAS PARA LA INDUCCION DE  
TEJIDO CALLOSO DE D. PURPUREA:

VARIABLE	TIEMPO	EXPLANTE	BALANCE HORMONAL 2,4-D/CINETINA	FOTOCONDICIONES
		HIPOCOTILO		
INDICE PESO SECO	4 SE- MANAS	" "	3 / 0 1 / 1	OSCURIDAD LUZ
INDICE PESO FRESCO	" "	" "	3 / 0 1 / 1	OSCURIDAD LUZ
FRIABILIDAD	" "	" "	TODAS BUENA	LUZ, OSCURIDAD, FOTOPERÓDO

## 10.0 CONCLUSIONES

- Tanto el balance hormonal como las fotocondiciones tiene un efecto importante sobre la cinética de crecimiento.
- Se encontró que las condiciones mas adecuadas se consiguen a balance hormonal 3.0/0.0 de ac. 2,4-D / Cinetina para oscuridad y a 1.0/ 1.0 de ác. 2,4-D / Cinetina para luz por lo que la presencia del glucósido , marcará la pauta en la elección de la relación hormonal más adecuada para el cultivo en suspensión de Digitalis purpurea.
- Respecto a la friabilidad fué adecuada para todas las relaciones hormonales evaluadas, lo cual es de suma importancia para el cultivo en suspensión.
- La resiembra del callo se realiza a las cuatro semanas. Después de ocho semanas de resembrado el callo en las mismas condiciones este no se diferencia.

## 11.0 RECOMENDACIONES

— Probar mediante Radioinmunoensayo y HPLC la detección y cuantificación del glucósido en tejido caloso de Digitalis a diferentes edades.

— De las concentraciones hormonales elegidas llevar el cultivo en suspensión , evaluando la cinética de crecimiento y producción de los glucósidos cardíacos para tejido caloso de Digitalis purpurea

— Determinar la curva de crecimiento celular de Tejido caloso usando la hormona AIA, tratando de evaluar su cinética.

— Probar al ác. Giberélico para elongar más el talluelo del hipocotilo que se obtiene a los 9 días después de germinar las semillas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Aberhart, T., Lloyd-Jones, M., Cospi, J., "Biosynthesis of Cardenolides in D. lanata ", Phytochemistry, 17 , (1973), 1065-71.
- 2 Barz, M., Wolfgany, L., Reinhard, et. al. "Plant Tissue Culture its --- Biotech.: Appl. Proc. Int. Congr. Inst. 1976", Berlin, Ger. (1977).
- 3 Bhagiath, S., Rastogi, R., "Cardenolides, Glycosides and genins", Phytochemistry, 9, (1970), 315-331.
- 4 Bennett R., Horst, H., and Heftmann, E., "Progesterones metabolism in Digitalis lanata", Phytochemistry, 7, (1968), 41-50.
- 5 Butcher , L., Dennis, N., "Plant Tissue Culture", (1976), 67.
- 6 Castle, M., "Isolation and quantitation of picomole quantities of Digo xin and their metabolites by HPLC", J.of Chromatography, 115 , (1975) 437-45.
- 7 Estadísticas del Instituto Nacional de Cardiología, 49(1-2), México, (1974)
- 8 Diario Oficial de la Federación "Cuadro de Medicamentos", lunes 12 de julio de 1982, Tomo 375, 8.
- 9 Döller, V., Alfermann, A., Reinhard, E., Planta Medica, 31, (1977), 3-6.
- 10 Döller, V., y Reinhard, E., "Biotransformation of Cardenolides", Planta Medica, 37 (3). (1979), 277-288.
- 11 Else, H., Pilgrim, T., Teascher, E., Pharmazie, 29, (1979), 727-28.
- 12 Einset, J., "Two effects of Cytokinin on the Auxina requeriment of Tobacco callus culture", Plant Physiol., 59, (1977), 45-47.
- 13 Fleischaxer, E., Weaver, M., Sinkey, L., "Instrumentation for process - culture control", Advances in applied Microbiology, 27, (1981), 137-67.
- 14 Furuya, T., Kojima, H., Syono, K., Phytochemistry, 10 , (1971), 1529.
- 15 Gamborg, O., Murashigue, T., Thorpe, T., Vasil, I., "Plant Tissue cultu re Media in vitro ", 12(7), (1976).
- 16 Kreig, B., Margaret, "Medicina Verde" , Ed. CECSA, México, 1968.
- 17 Goodman, L., Gilman, A., "Bases Farmacológicas de la Terapéutica", Ed. Interamericana , 4a. ed., (1974).
- 18 Gopa, S., Indian Drugs, 18 (9), (1981), 317-18.
- 19 Goordmann, G., y Reinhard, E., Phytochemistry, 11, (1972), 917.
- 20 Günter, Th., y Linde, H., "Cardiac Glycosides, prerequisites for develop ment of new Cardiotonic Compounds ", Experientia, 33 (6), (1977), 697-836.

- 21 Gurny, L., Vaganat, P., et raport anidis, "Cultures de cals de Digitalis purpurea L." Pharm. Acta. Helv. 55, (11-12), (1980),
- 22 Hagimori, M., Matsumoto, T., Kasaki, N., "Studies on the production of Digitalis cardenolides by plant tissue culture", - Plant Cell Physiol, 21(8), (1980), 1391-1404.
- 23 Hagimori, M., y col. Plant Cell Physiol 23(7), (1982), 1205-11
- 24 Hagimori, M., Matsumoto, T., y Obi, V., Plant Cell Physiol, 69 (1982), 653-56.
- 25 Heramann, I., y Repke, K., Experientia 19 , (1963), 472.
- 26 Heins, M., Nahl, J., Herch, H., y col. , "Preparation of -metil digoxin by hidroxilation of Metildigitoxin in fermenter cultures of Digitalis lanata", Planta Medica, 35, (1978), 57-62.
- 27 Hirotani, M., y Furuya, T., "Biotransformation of digitoxigenin by cell suspension cultures of Digitalis purpurea", Phytochemistry, 19 , (1981), 531-34.
- 28 Hirotani, M., y Furuya, T., Phytochemistry, 19, (1980), 531-34.
- 29 James, I., Veliki, J., Osukko, M., "Biotransformation of Cardenolides by plant cell suspension cultures", Lloydia, 41(5), (1978) 475-87.
- 30 Kartnig, T., y col., Planta Medica 35(2), (1979), 275-78.
- 31 Kartnig Von Th., Russheim, H., y Maunz B., "Cardenolide in Oberflächen kulturen aus keim-und laubblättern von D. purpurea" --- Planta Medica, 29 , (1976), 275-82.
- 32 Kartnig, Von T., Russheim, H., Treusil, V., Maunz, B., "Cardenolides in callus culture of D. purpurea and D. lanata", Planta Medica, 35, (1979), 275-78.
- 33 Kurz , W., y Constabel, F., "Plant cell cultures a potential Source of Pharmaceuticals", Adv. in Apl. Microbiol., 25, (1979), 209-40.
- 34 Lui, J., y Staba, E., " Effects of age and growth regulators on serially propagated Digitalis lanata leaf and root cultures", Planta Medica, 41, (1981), 90-95.
- 35 Lui, J., y Staba, E., "Effects of presursors on serially propagated D. lanata leaf and root cultures", Phytochemistry, 18, (1979) 1913-19.
- 36 Murashigue, T., y Skoog, F., Physiologia, 15, (1962), 73.

- 37 Tesis L. Fernández, "Metabolismo de Nitrógeno de Cultivo de Tejidos de Bouvardia Ternifolia", Fac. de Química, División de Estudios de Posgrado, UNAM, (1979).
- 38 Tesis Rodríguez, R., "Obtención de digitoxigenina a partir de semillas de thevetia", FNEH Zaragoza, UNAM, (1982).
- 39 Robert, M., "la modificación de las células vegetales en cultivo", CONACYT, 2a., ed., (1981).
- 40 Singh, B., y Rastogi, R., *Phytochemistry*, 9, (1970), 315-331.
- 41 Staba, E., *J. Pharm. Sci.*, 51(3), (1962), 249-54.
- 42 Staba, E., "Plant Tissue cultures as a source of Biochemicals", C.R.C. Press, Inc., Boca raton, Florida, (1980), 1115-1122.
- 43 Steward, I., Mott, B., "The isolation and culture of free from higher plants", *Methods Enzymology*, 32, (1974), 723-32.
- 44 Yamada, Y., y Sato, F., *Plant Cell Physiol.*, 19, (1978), 691-99.
- 45 Yoshikawa, M., y Furuya, T., "Biotransformation of digitoxigenin by Cell suspension cultures of *D. purpurea*", *Phytochemistry*, 19, (1980) 531-39.
- 46 Estadísticas del Instituto Mexicano de Comercio Exterior, (1974-83).
- 47 Cruz, I., García, J., Muchoasky, J., Regla, I., *J. Org. Chem.*, 42, (1977), 3580.
- 48 Furuya, T., Kowaguchi, K., y Hirofani, M., *Phytochemistry*, 12(1), (1977), 1621-26.
- 50 El-Nit, Abo, M., Hildebrant, y Evert, R., *in vitro* 12(8), 602-604. (1977).
- 51 Gopa, G., y Datta, P., *Planta Medica*, 41(4), (1981), 415-17.
- 52 Staba, J., y Lambda, S., *Lloydia*, 26 (1), (1963), 29-35.
- 53 Bandiero, M., y Morpurgo, G., *Experientia*, 26(5), (1962), 679.
- 54 Dennis, N., Butcher, L., David, S., Ingram., *Plant Tissue Culture* (1976), 67.
- 55 Yeoman, M., *Int. Rev. Citol.* 29, (1970), 383-409.
- 56 King, P., *Adv. in Biochem. Eng.* 18, (1980), 1-38.
- 57 Staba, J., y Lui, H., *Planta Medica*, 41, (1981), 90-95.
- 58 Vogel, G., Luckner, M., "Distribution of Cardenolides in *Digitalis lanata*", *Planta Medica*, 41, (1981), 161-65.
- 59 Robert, M., y Loyola, V., "Cultivo de Tejidos Vegetales en México" CONACYT, México, (1985), pp. 167.