

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FITOQUÍMICOS A PARTIR DE  
CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Nerium oleander***

**JUAN ALEJANDRO PÉREZ BRAN  
INGENIERO QUÍMICO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MEDELLÍN  
2010**

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FITOQUÍMICOS A PARTIR DE  
CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Nerium oleander***

**JUAN ALEJANDRO PÉREZ BRAN  
INGENIERO QUÍMICO**

**Tesis de maestría en Ciencias - Biotecnología**

**Director  
MARIO ARIAS ZABALA.  
Ing. Químico, Ph. D.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MEDELLÍN  
2010**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Director y asesor Mario Arias Zabala, por su apoyo permanente, perseverancia y paciencia en la realización del proyecto de investigación.

Al profesor Kenneth Roy Cabrera por sus aportes en el análisis estadístico de los resultados.

A los investigadores del Laboratorio de Bioconversiones de la Universidad Nacional de Medellín, especialmente Juan Manuel Restrepo y Miguel Octavio Pérez por su colaboración en la parte experimental.

Al profesor Jair Gaviria, director del Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Sede Medellín, por su colaboración con los análisis cromatográficos.

A la Universidad Nacional de Colombia y la Dirección de Investigación Medellín (DIME) por el financiamiento de este trabajo.

A mi esposa, por el apoyo constante, moral e incondicional en la continuación y culminación de este trabajo.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	12
1. MARCO TEÓRICO .....	16
1.1 ASPECTOS SOBRE <i>Nerium oleander</i> .....	16
1.1.1 Generalidades .....	16
1.1.2 Metabolitos y actividad biológica de <i>Nerium oleander</i> .....	18
1.2 OBTENCIÓN DE CALLOS .....	20
1.3 MEDIOS DE CULTIVO .....	22
1.3.1 Macronutrientes .....	22
1.3.2 Micronutrientes .....	23
1.3.3 Vitaminas .....	24
1.3.4 Hormonas .....	25
1.4 SUSPENSIONES CELULARES .....	26
1.4.1 Cinética de crecimiento celular .....	28
1.4.2 Métodos para medir el crecimiento de las células en suspensión .....	29
1.4.3 Características de las suspensiones .....	30
1.5 METABOLITOS SECUNDARIOS .....	31
1.6 INDUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS .....	31
1.6.1 Selección de células de alta producción .....	32
1.6.2 Manipulación de nutrientes para incrementar el rendimiento .....	33
1.6.3 Precursor alimenticio .....	34
1.6.4 Elicitación .....	34
2 OBJETIVOS .....	38
2.1 GENERAL .....	38
2.2 ESPECÍFICOS .....	38
3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES .....	39
3.2 INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE CALLOS .....	39
3.2.1 Obtención y siembra de explantes .....	39
3.2.2 Formación de callos .....	39

3.3	ESTABLECIMIENTO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES.....	40
3.4	DETERMINACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO .....	41
3.5	ESTUDIO DE ELICITACIÓN .....	42
3.6	DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS .....	43
4	RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	45
4.1	OBTENCIÓN Y SIEMBRA DE EXPLANTE .....	45
4.2	ESTABLECIMIENTO DE CALLOS .....	45
4.3	ESTABLECIMIENTO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES.....	49
4.3.1	Etapa de disgregación.....	49
4.3.2	Estudio del efecto de la combinación hormonal .....	51
4.4	DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO.....	53
4.5	ANÁLISIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	57
4.6	ESTUDIO DE ELICITACIÓN .....	61
5	CONCLUSIONES .....	62
6	RECOMENDACIONES.....	64
7	BIBLIOGRAFÍA.....	66

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación Científica de <i>Nerium oleander</i> .....	16
<b>Tabla 2.</b> Diseño experimental para la etapa de callogénesis .....	40
<b>Tabla 3.</b> Diseño experimental para el establecimiento de suspensiones .....	41
<b>Tabla 4.</b> Diseño experimental para el estudio del efecto elicitor de MeJ .....	42
<b>Tabla 5.</b> Muestras del diseño de elicitación .....	43
<b>Tabla 6.</b> Métodos analíticos por HPLC para metabolitos de <i>Nerium oleander</i> .....	44
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de formación de callos según la combinación de los reguladores de crecimiento quinetina y 2,4-D .....	46
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza para la formación de callos de <i>Nerium oleander</i> ....	47
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza para la concentración celular en fase estacionaria de células en suspensión de <i>Nerium oleander</i> .....	51
<b>Tabla 10.</b> Valores de velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ) para diferentes especies de células vegetales cultivadas en suspensión .....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura molecular de la oleandrina.....	19
<b>Figura 2.</b> Fases del crecimiento celular.....	28
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de formación de callos de <i>Nerium oleander</i> durante cuatro semanas, en función de la concentración de 2,4-D (0,1, 1,5, 3,0 ppm.), para los tres niveles de quinetina, intervalo de confianza de 95%.....	48
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de formación de callos de <i>Nerium oleander</i> durante cuatro semanas, en función de la concentración de quinetina (0,1, 0,5, 1,0 ppm.), para los tres niveles de 2,4-D, intervalo de confianza de 95%.....	49
<b>Figura 5.</b> Concentración de células secas de <i>Nerium oleander</i> en función de la concentración de 2,4-D para los tres niveles de quinetina (0,1, 0,5, 1,0 ppm.), intervalo de confianza de 95%.....	52
<b>Figura 6.</b> Concentración de células secas de <i>Nerium oleander</i> en función de la concentración de quinetina para los tres niveles de 2,4-D (0,1, 1,5, 3,0 ppm.), intervalo de confianza de 95%.....	53
<b>Figura 7.</b> Crecimiento de células en suspensión de <i>Nerium oleander</i> .....	55
<b>Figura 8.</b> Curva de crecimiento de células en suspensión de <i>Nerium oleander</i> , intervalo de confianza de 95%.....	56
<b>Figura 9.</b> Cromatograma del estándar de betulina con una concentración de 100 ppm.....	58
<b>Figura 10.</b> Cromatograma del estándar de peruvósido con una concentración de 100 ppm.....	58
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas de HPLC obtenidos para el análisis de betulina de muestras de suspensiones celulares de <i>N. oleander</i> .....	59
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas de HPLC obtenidos el día cero para el análisis de peruvósido sin adición de MeJ a cultivos de suspensiones celulares de <i>N. oleander</i> .....	60
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas de HPLC obtenidos en el día tres para el análisis de	

peruvósido con adición de MeJ en el día cero a los cultivos resuspensiones celulares de <i>N. oleander</i> .....	60
---	----



## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1.</b> Hojas y flores típicas de <i>Nerium oleander</i> .....	17
<b>Fotografía 2.</b> Callos de <i>Nerium oleander</i> después de 3 subcultivos.....	46
<b>Fotografía 3.</b> Suspensiones celulares de <i>Nerium oleander</i> .....	50

## RESUMEN

El cultivo de células vegetales *in vitro* es una técnica utilizada para obtener sustancias de interés comercial, especialmente de tipo farmacológico, por las ventajas presentes en la manipulación de medios de cultivos y condiciones ambientales que favorecen la producción de metabolitos secundarios. Esta técnica viene implementándose en varias especies vegetales en Colombia, especialmente en los laboratorios de investigación de la ciudad de Medellín.

*Nerium oleander* es una planta ornamental propia de áreas subtropicales, sus extractos han sido utilizados en forma casera en tratamientos contra la indigestión, la malaria, enfermedades de la piel, enfermedades venéreas, enfermedades neuronales, entre otros. A nivel clínico es reconocida por los efectos cardiotónicos y antitumorales de sus metabolitos secundarios.

En el presente trabajo se estudió el establecimiento de cultivos de callos y suspensiones celulares de *Nerium oleander* a escala de matraz agitado, y la eventual producción de peruvósido y betulina, a partir de explantes de hojas de arbustos nativos de la ciudad de Medellín, así como el efecto elicitor que pudiera tener el metil jasmonato (MeJ) sobre la producción de dichos metabolitos secundarios.

Durante el establecimiento del cultivo de callos de *N. oleander*, utilizando como medio basal de crecimiento MS (Murashige y Skoog, 1962), se determinaron las mejores condiciones, respecto a varios niveles de concentración específicos, de la composición hormonal de 2,4-D y quinolina, sobre la formación de callos friables. Así mismo, para el establecimiento de suspensiones celulares en medio basal MS, se determinaron las mejores concentraciones, para el crecimiento celular.

Adicionalmente, se estudió el efecto elicitor que pudiera tener el metil jasmonato (MeJ) sobre la producción de los metabolitos en las suspensiones celulares de *Nerium oleander*, en concentraciones de 1, 10 y 100 ppm, aplicado en las distintas fases del crecimiento.

Los mejores niveles hormonales encontrados para la formación de callos friables de *Nerium oleander*, para la auxina 2,4-D fue de 1.5 ppm, y para la citoquinina quinetina fue de 0.5 ppm, correspondiente a una relación auxina/citoquinina de 3.

Iguales resultados se encontraron en el establecimiento de las suspensiones respecto al crecimiento celular. En la curva de crecimiento no se observó fase *lag*, mas sí se presentó una fase exponencial de 5 días y una fase estacionaria de 7 días. De acuerdo con la cinética de crecimiento, se obtuvo una tasa específica máxima de crecimiento celular,  $\mu_m$ , de 0.608 días<sup>-1</sup> y un tiempo de duplicación de la biomasa,  $t_d$ , de 1.14 días. No se detectó la formación de peruvósido y betulina en ninguna de las distintas fases del crecimiento.

Finalmente, se encontró que el MeJ no elicita la producción de peruvósido y betulina en suspensiones celulares de *Nerium oleander*.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de células vegetales fue desarrollado como una herramienta para estudiar el metabolismo de las plantas, su fisiología y desarrollo. Sin embargo los cultivos de células vegetales también han sido vistos como una posible fuente de productos naturales. El desarrollo de cultivos de células vegetales y de técnicas de inducción de los metabolitos secundarios, constituyen una alternativa biotecnológica al cultivo de las plantas completas, para la obtención de valiosos productos (Serrano et al., 1991). Los estudios sobre obtención de metabolitos secundarios se han incrementado durante los últimos 50 años (Bourgand et al., 2001) y se han acelerado en forma considerable en esta última década. Muchos sistemas con sustancias activas farmacéuticas y de gran valor industrial e interés investigativo han sido patentados en los últimos 20 años (Kieran et al., 1997).

Dadas las especificidades de las células vegetales, cuando se las compara con células microbianas, no es posible aplicar directamente muchas de las técnicas desarrolladas y relativamente bien establecidas de las fermentaciones microbianas a las fermentaciones con células vegetales, haciéndose necesario investigar las mejores condiciones de operación para conducir estas últimas, tanto a escala de laboratorio, como a escalas piloto e industrial.

El cultivo de tejidos y células de plantas puede ser establecido colocando explantes en un medio nutritivo bajo condiciones asépticas. Estos explantes pueden ser inducidos para formar cultivos de callos desdiferenciados, o brotes diferenciados, raíces, o cultivos de embriones, mediante la adición de reguladores de crecimiento. Los callos pueden ser transferidos a un medio líquido para formar cultivos de células en suspensión que pueden crecer en biorreactores, de forma similar a las fermentaciones microbianas. Se ha producido en cultivo de células vegetales una amplia variedad de compuestos útiles en alimentos incluyendo

sabores, colorantes, aceites esenciales, edulcorantes, antioxidantes y nutracéuticos y se han desarrollado varios sistemas de células en suspensión a gran escala. Las células vegetales son también excelente fuente para aislamiento de enzimas mucho mejores, en algunos casos, que las de la planta diferenciada misma (Alfermann y Petersen, 1995)

Los tres sistemas diferentes de cultivo de células vegetales que son frecuentemente considerados para producción de metabolitos son las suspensiones celulares, las células artificialmente inmovilizadas y el cultivo de raíces peludas (“hairy roots”). La suspensión celular es el sistema más ampliamente usado de los tres anteriores. Debido a su aproximación a cultivos microbianos, pueden ser usados biorreactores convencionales para su cultivo. Por tanto, el conocimiento básico, la tecnología y el equipamiento para operación del proceso a gran escala están disponibles. Varios estudios han mostrado que es posible cultivar suspensiones de células vegetales en grandes volúmenes (Schlatmann et al., 1996) y se han implementado diferentes estrategias como selección de líneas celulares de alta producción de metabolitos, cultivos *in vitro*, selección y optimización del medio, uso de precursores y de sustancias elicitoras, entre otras estrategias, con el fin de aumentar la producción de los metabolitos secundarios vegetales.

Actualmente en el arte de la bioingeniería de células vegetales, el cultivo de células en suspensión tiene un gran potencial en el escalado exitoso para producción de metabolitos secundarios. Las principales ventajas de las suspensiones de células vegetales sobre otros sistemas celulares son:

1. Las suspensiones celulares pueden ser cultivadas en biorreactores convencionales, algunas suspensiones han sido cultivadas con éxito a escala industrial (75000 litros) (Schaltmann et al., 1996).

2. Densidades celulares altas de más de 50 g/l pueden ser fácilmente alcanzables.
3. El control de importantes parámetros del proceso es posible, aún a altas densidades celulares.
4. El modelamiento matemático es simplificado, debido a la homogeneidad del cultivo.

Aunque el número de cultivos celulares de alto rendimiento se incrementa anualmente, hay especies vegetales que fallan en producir sus productos naturales importantes cuando son cultivadas en la forma de un cultivo celular no diferenciado. El principal obstáculo para un uso más común de cultivos de células vegetales es de tipo biológico. El problema más severo es que no puede ser predicho si las células de una especie en particular producirán el compuesto de interés cuando sean cultivadas *in vitro*. En contraste, otros cultivos celulares pueden producir metabolitos que aún no se sabe que ocurran en las respectivas plantas de origen (Kreis y Reinhard, 1989). En otras especies, debido a la complejidad de las rutas metabólicas para su síntesis, no existe otra alternativa que el empleo de la planta completa para la producción de muchos de sus metabolitos secundarios.

Los cultivos de células vegetales más extensamente estudiados son *Nicotiana tabacum*, por su fácil crecimiento y simple cuantificación de metabolitos secundarios, y *Catharanthus roseus*, por el alto valor económico de sus alcaloides indólicos. Otra especie ampliamente estudiada es *Digitalis lanata*, por la síntesis de metabolitos tipo glicósidos cardiotónicos, de gran aplicación en fármacos para el control de arritmias cardíacas. En aras de esta última aplicación el presente trabajo pretende desarrollar una metodología para el establecimiento de células en suspensión de *Nerium oleander*, especie vegetal que ha mostrado tener una

actividad cardiotónica mayor que su antecesora *Digitalis lanata* y estudios recientes se han enfocado en su efecto antitumoral. Los trabajos registrados acerca del establecimiento *in vitro* de células de *N. oleander* y producción de sus metabolitos secundarios son escasos. Ibrahim y colaboradores (2009) realizaron estudios sobre el efecto de diferentes medios de cultivo naturales, reguladores de crecimiento vegetal, fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato, luz, pH, velocidad de agitación y alimentación de sustrato, sobre la producción de oleandrina en cultivos de suspensiones celulares de *Nerium oleander*. Profumo y colaboradores (1993) evaluaron la producción de glicósidos cardiotónicos a partir de callos obtenidos de explantes de hojas de *Nerium oleander* L.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 ASPECTOS SOBRE *Nerium oleander*

#### 1.1.1 Generalidades

*Nerium oleander* es una especie vegetal perteneciente a la familia Apocynaceae. Su nombre deriva del griego “Neros” (húmedo) aludiendo a los lugares con abundante agua donde se encuentra, “olae” (olivo) por la forma de sus hojas y “dendron” árbol. En Colombia y mayor parte del mundo su nombre común es adelfa, también se le conoce como baladre, trinitaria, laurel de flor, rosa laurel; en Medellín comúnmente se denomina azuceno de la habana (Martínez, 2002).

**Tabla 1.** Clasificación Científica de *Nerium oleander*

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Subreino:</b>	Tracheobionta
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Asteridae
<b>Orden:</b>	Gentianales
<b>Familia:</b>	Apocynaceae
<b>Subfamilia:</b>	Apocynoideae
<b>Tribu:</b>	Wrightieae
<b>Género:</b>	<i>Nerium</i>
<b>Especie:</b>	<i>oleander</i>

Fuente: [http://en.wikipedia.org/wiki/Nerium\\_oleander](http://en.wikipedia.org/wiki/Nerium_oleander)



Es un arbusto que puede llegar a alcanzar los 6 metros de altura, de crecimiento rápido, presenta hojas lanceadas, borde afilado de 6 a 12 cm de color verde grisáceo, las flores pueden ser de color blanco, rosado o rojo de 3 a 4 cm de diámetro. Sus hojas, tallos, frutos y semillas son venenosas (Hafeez, 1987).

**Fotografía 1.** Hojas y flores típicas de *Nerium oleander*



Esta especie se encuentra principalmente en Europa y el oriente medio de Asia y se ha extendido como planta ornamental en muchas partes del mundo. En Colombia se encuentra en jardines y zona boscosa de Avenidas y laderas ribereñas. Crece en sitios arenosos y calizos con exposición a pleno sol, especialmente en los cauces que permanecen secos la mayor parte del año. El grado de toxicidad es alto, en ocasiones el consumo ha producido envenenamiento en niños y animales al masticar las hojas o los tallos de la planta y en algunas regiones ha sido utilizada como abortivo. Los síntomas presentes iniciales más comunes después de la ingestión son debilidad, sudor, irritación bucal y estomacal, vómitos, diarreas, gastroenteritis con hemorragias y temblor. Posteriormente puede producir estado de coma y finalmente la muerte (Hafeez, 1987). Estos síntomas se deben principalmente a la oleandrina, un glicósido cardiotónico que presenta un mecanismo de acción más potente que otros

heterósidos cardiotónicos como la digoxina obtenida de la *Digitalis lanata*. La oleandrina actúa inhibiendo la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana (bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ); aumentando el  $\text{Na}^+$  intracelular y el intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , aumentando también de esta forma el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual aumenta la contractibilidad del miocardio. A pesar del efecto tóxico de los extractos de *Nerium oleander*, éstos son utilizados en medicina popular para tratamientos contra la indigestión, la malaria, enfermedades de la piel (lepra), enfermedades venéreas (la sarna) y enfermedades mentales (Ibrahim et al., 2007). También ha sido utilizado como diurético y en muchas aplicaciones induce el estornudo. En la veterinaria popular se prepara una loción de uso externo con extractos de la hoja mezclados con miel para uso antiparasitario.

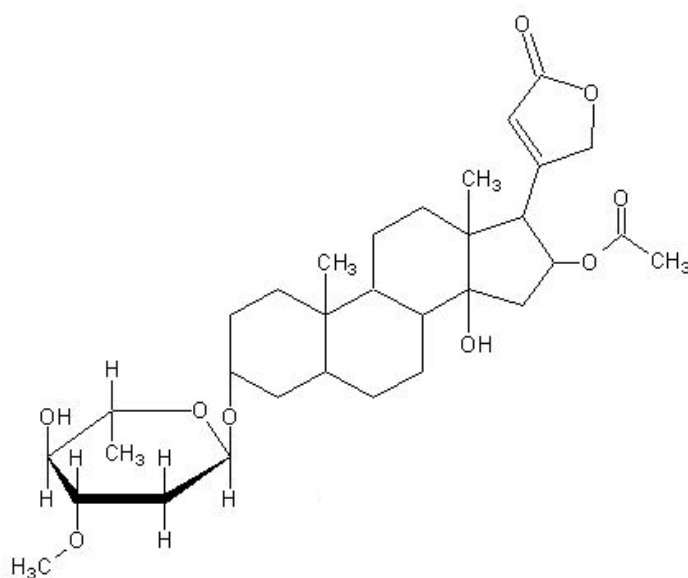
Desde el punto de vista clínico, se han realizado investigaciones de su posible uso: efecto de la oleandrina sobre el crecimiento de células tumorales pancreáticas humanas (Newman et al., 2007) y, a mayores concentraciones, el extracto de la planta presenta un marcado efecto antileucémico (Turán et al., 2006), uso de la oleandrina como inhibidor de determinados biomarcadores tumorales en el tratamiento de cánceres cutáneos (Afaq et al., 2004), efecto antitumoral en células de cáncer de próstata (Smith et al., 2001), efecto cardiotónico de extractos de *Nerium oleander* (Adome et al., 2003) y el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de flores de *Nerium oleander* (Erdemoglu et al., 2003)

### **1.1.2 Metabolitos y actividad biológica de *Nerium oleander***

Gran parte de los metabolitos secundarios presentes en la planta tienen actividad biológica y corresponden principalmente a los glucósidos cardiotónicos entre los que se encuentran: oleandrina (Figura 1), oleandrigenina, diacetiloleandrina, odorósido, neriósido, nerifolina y betulina, entre otros. En la última década los estudios de esta especie vegetal han despertado numerosas investigaciones no

sólo a nivel toxicológico si no a nivel clínico con mayor énfasis en la estructura y composición de la planta. El número de compuestos nuevos encontrados en esta especie se ha incrementado. En el 2007 se identificaron 4 nuevos cardiotónicos que se suman a los nueve conocidos con anterioridad (Zhao et al., 2007). Duke J. (2009) reporta otros compuestos encontrados en *Nerium oleander*.

**Figura 1.** Estructura molecular de la oleandrina.



Desde el punto de vista clínico, se han desarrollado trabajos que muestran el uso medicinal de los metabolitos, especialmente la oleandrina. Los mecanismos de inhibición de la proliferación de células tumorales por glicósidos cardiotónicos de *Nerium oleander* como alteración de la fluidez de la membrana celular, decrecimiento de la activación del factor de transcripción nuclear NF-kB, JNK y AP-1, incremento del calcio intracelular, incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño oxidativo y daño mitocondrial, decrecimiento de la fosforilación de Akt, entre otros, se pueden observar en el resumen elaborado por Newman (2008).

A nivel comercial, un extracto acuoso patentado con el nombre de Anvirzel, con certificado de registro sanitario por La Secretaría de Salud de Honduras y distribuido por Salud Integral S.A. de Honduras, ha mostrado actividad antitumoral *in vitro* (Smith et al., 2001). El mecanismo de acción consiste en la inhibición del transporte del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), implicado en varios procesos biológicos como diferenciación, crecimiento y migración celular, angiogénesis y formación tumoral, a través de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Screenivasan et al., 2003). Esta acción se produce a concentraciones no tóxicas de oleandrina; algunos estudios publicados han confirmado que los glicósidos cardiotónicos tienen un selectivo efecto sobre la proliferación de células malignas pero no de células normales (Sreenivasan et al., 2003). El Anvirzel y su principio activo, la oleandrina, son capaces de suprimir la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1, implicados en la iniciación, promoción y metástasis tumoral. Por otro lado, el extracto metabólico tiene efecto depresor sobre el sistema nervioso central (SNC) a dosis de 25 mg/kg, acción debida a sustancias de tipo cardenólido (neridiginósido, nerizósido, neritalósido y odorósido-H).

## **1.2 OBTENCIÓN DE CALLOS**

Las células vegetales poseen dos características que las hacen especiales: la totipotencia, capacidad inherente de una célula para generar una planta completa y la desdiferenciación, capacidad para volver al estado meristemático de una célula diferenciada, situación que no ocurre en células animales. Para que una célula vegetal exprese su totipotencia debe experimentar una desdiferenciación y luego una nueva diferenciación de acuerdo a las condiciones ambientales del cultivo. Esto puede lograrse si se colocan partes pequeñas de un tejido u órgano de la planta (explante) en un medio de cultivo apropiado con los nutrientes y reguladores de crecimiento, los cuales manipulados convenientemente pueden generar callos o desarrollar yemas o embriones (Skoog y Miller, 1957).

Los callos se pueden definir como masas de tejido parenquimático indiferenciado en crecimiento activo. Son agregados celulares amorfos que surgen del crecimiento desorganizado de explantes sobre un medio de cultivo específico en condiciones asépticas. Estos agregados celulares no se corresponden con ningún tejido particular de la planta completa. El término cultivo de callos fue escogido debido a que la proliferación celular se pensaba era inducida por la herida del explante durante la escisión. Sin embargo se ha encontrado que es inducido por reguladores de crecimiento de la planta en el medio de cultivo sólido. Las hormonas y los reguladores de crecimiento en general son los responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza y que determinan el crecimiento activo de todos los órganos (Whahby, 2007); su manera de actuar es debida a una respuesta compleja sobre factores como la mitosis, polarización, formación de los primordios y desarrollo de los meristemas. Una vez formados los callos, puede presentarse una variación somaclonal, normalmente durante los repetidos subcultivos de mantenimiento de los callos. Este es un período crítico porque debido a esta variación somaclonal la producción de metabolitos puede variar de subcultivo en subcultivo (Bourgand et al., 2001). Después de cierto tiempo se alcanza una estabilidad genética y cada callo puede ser considerado un agregado celular homogéneo.

Uno de los usos principales del cultivo de callos es la obtención de suspensiones celulares. En muchos casos, para obtener suspensiones celulares finas, es adecuado aumentar la friabilidad (callo disgregado y esponjoso) del tejido calloso por incremento de la concentración de la auxina o disminución de la citoquinina en el medio de crecimiento. Dependiendo de la especie utilizada el ciclo de subcultivo a partir de callo es de 4 semanas de acuerdo con la especie. Callos con crecimientos más rápidos deberán subcultivarse cada dos semanas para renovación de las células. Para crecimientos muy lentos no es conveniente demorar los subcultivos por más de seis semanas.

### **1.3 MEDIOS DE CULTIVO**

Son muchos los medios de cultivo utilizados en suspensiones celulares vegetales que suministran los elementos esenciales para el desarrollo y mantenimiento celular. El medio de cultivo más utilizado es el medio MS; éste tiene altos niveles de nitrógeno inorgánico y de sales minerales, mientras que otras formulaciones, como NN (Nietsch et al., 1967) tienen niveles muy bajos de nitrógeno inorgánico y el medio White (1943) tiene bajo contenido de sal. En general, hay una tendencia a usar niveles más bajos de  $\text{NH}_4^+$  que de  $\text{NO}_3^-$  en medios para cultivos de tejidos vegetales. La cantidad de  $\text{NH}_4^+$  en el medio MS es casi la mitad que de  $\text{NO}_3^-$ , mientras otras formulaciones, tales como SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), B5 (Gamborg et al., 1968) y GD (Gresshoff y Doy, 1974), contienen niveles aún más bajos de  $\text{NH}_4^+$ . La fuente de carbono comúnmente utilizada es la sacarosa en concentraciones de 3%, este azúcar es fosforilado y luego forma un compuesto complejo con una molécula transportadora que facilita su ingreso a la célula a través de la membrana plasmática (Vásquez y Torres, 1995). La adición de vitaminas mejora ostensiblemente el crecimiento de los cultivos vegetales y las hormonas son necesarias para el alargamiento, crecimiento y división celular.

#### **1.3.1 Macronutrientes**

Los macronutrientes proveen los seis principales elementos, nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), requeridos para el crecimiento de las plantas. La concentración óptima de cada nutriente para alcanzar las máximas tasas de crecimiento varía considerablemente entre especies.

Los medios de cultivo deben contener suficiente nitrógeno inorgánico para un adecuado crecimiento de la célula vegetal. Las células vegetales pueden crecer

solo en nitratos, pero resultados considerablemente mejores son obtenidos cuando el medio contiene tanto nitrato como amonio (Roca y Mrogiski, 1991).

Los nitratos son normalmente suministrados en el intervalo de 25-40 mM, mientras que concentraciones típicas de amonio varían entre 2 y 20 mM. Concentraciones superiores a 8 mM pueden ser letales para el crecimiento celular de algunas especies. Las células pueden crecer en un medio de cultivo conteniendo amonio como única fuente de nitrógeno, si uno o más de los ácidos del ciclo del ácido tricarboxílico, como citrato, succinato o malato, están presentes en concentraciones de aproximadamente 10 mM. Cuando las fuentes de nitrógeno, nitrato y amonio, están presentes en el medio de cultivo, los iones amonio serán utilizados más rápidamente que los iones nitrato.

El potasio es requerido para el crecimiento celular de muchas especies vegetales. La mayoría de los medios de cultivo contienen potasio en forma de nitrato o cloruro, a concentraciones de 20-30 mM.

Las concentraciones óptimas de P, Mg, S y Ca varían entre 1-3 mM cuando son satisfechos todos los otros requerimientos para el crecimiento celular; en ocasiones son necesarias concentraciones más altas si existen deficiencias en otros nutrientes

### **1.3.2 Micronutrientes**

Los minerales esenciales para el crecimiento de tejidos y células vegetales incluyen hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), y molibdeno (Mo). El hierro puede ser el más crítico de todos los minerales. Pueden ser usados citrato y tartrato de hierro en medios de cultivo, pero estos compuestos son difíciles de disolver y frecuentemente precipitan luego de que los medios son preparados. El empleo del complejo EDTA-hierro puede superar este problema;

sin embargo estos complejos no son completamente estables, particularmente en cultivo líquido, y pueden precipitar luego de unos pocos días.

Cobalto (Co) y yodo (I) también pueden ser adicionados a ciertos medios, pero no se han establecido los requerimientos estrictos de estos elementos para el crecimiento celular. Sodio (Na) y cloro (Cl) también son utilizados en algunos medios de cultivo pero no son esenciales para el crecimiento celular. Cobre (Cu) y Co son adicionados normalmente a medios de cultivo en concentraciones de 0.1  $\mu\text{M}$ , Fe y Mo a 1  $\mu\text{M}$ , I a 5  $\mu\text{M}$ , Zn a 5-30  $\mu\text{M}$ , Mn a 20-90  $\mu\text{M}$ , y B a 25-100  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, el crecimiento está más limitado por las otras variables, especialmente por las hormonas, que por los microelementos (Roca y Mrogiski, 1991)

### **1.3.3 Vitaminas**

Las vitaminas son requeridas por las plantas como catalizadores en varios procesos metabólicos. Las células y tejidos vegetales cultivados in vitro, requieren algunas vitaminas y se consideran factores muy importantes en el crecimiento celular. Las vitaminas más frecuentemente utilizadas en medios de cultivo de células y tejidos vegetales incluyen tiamina ( $B_1$ ), ácido nicotínico, piridoxina ( $B_6$ ), y myo-inositol. La tiamina es indispensable para los cultivos celulares en concentraciones de 0.1 a 10.0 mg/L. El ácido nicotínico es utilizado normalmente en concentraciones de 0.1-5.0 mg/L; la piridoxina es utilizada entre 0.1-10.0 mg/L. La vitamina que es básicamente requerida por todas las células vegetales para el crecimiento es la tiamina. El ácido nicotínico y la piridoxina son con frecuencia adicionados a los medios de cultivo, pero no son esenciales para el crecimiento celular en muchas especies. El myo-inositol es comúnmente incluido en muchas soluciones de vitaminas ya que ha mostrado estimular el crecimiento en ciertos cultivos de células. Su presencia en el medio de cultivo no es esencial, pero en pequeñas cantidades estimula el crecimiento celular en muchas especies.



Otras vitaminas como biotina, ácido fólico, ácido ascórbico, ácido pantoténico, vitamina E (tocoferol), riboflavina, y ácido p-aminobenzoico han sido incluidas en algunos medios de cultivo. El requerimiento de estas vitaminas por cultivos de células vegetales es generalmente despreciable, y no son consideradas factores limitantes del crecimiento. Son generalmente adicionadas al medio de cultivo solo cuando la concentración de la tiamina está por debajo del nivel deseado o cuando es deseable crecer células a muy bajas densidades de población.

#### **1.3.4 Hormonas**

Las hormonas vegetales regulan y controlan un gran número de eventos en la planta, tales como el crecimiento, la diferenciación celular, la división celular, la floración, la germinación y la formación del fruto. Los mecanismos intervenidos incluyen cambios en la expresión genética, en el citoesqueleto y en la regulación de las rutas metabólicas. Entre las hormonas naturales más conocidas se encuentran las auxinas, las citoquininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico y de estas las más utilizadas en investigación sobre cultivos celulares en suspensión son las auxinas y las citoquininas.

Las auxinas y las citoquininas son dos grupos de reguladores hormonales que inician el crecimiento celular desdiferenciado y promueven la división celular, respectivamente. Las auxinas más importantes son el ácido indolacético (IAA), ácido indolbutírico (IBA), 4-cloro indolacético (4-cloro IAA), ácido fenilacético (PAA) de carácter hormonal (naturales) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2-metil-4-cloro fenoxiacético de carácter sintético. Las citoquininas más comunes son la quinetina, N-bencilaminopurina, zeatina y 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -deimetilamino) purina. Las auxinas promueven la elongación de raíces a bajas concentraciones provocando un ablandamiento de la pared celular y por ende su crecimiento mientras que las citoquininas favorecen la división celular

y en el cultivo in vivo estimula el crecimiento y desarrollo de la planta, disminuyen la dominancia apical por lo que promueven la formación de brotes axiales, retardan el envejecimiento y en concentraciones elevadas pueden inducir la formación de brotes adventicios e inhibir la formación de raíces (Wahby, 2007).

Las concentraciones de los reguladores de crecimiento requeridas dependen del objetivo propuesto y la especie a emplear. En ciertos valores sirve para mantener una línea de callos no diferenciados de una especie y pueden inducir organogénesis en otras. En referencia a la relación citoquininas/auxinas, el efecto puede conducir a la formación de yemas, crecimiento de callos indiferenciados o a la formación de tejidos de raíz.

En los cultivos celulares, es necesario utilizar concentraciones de hormonas considerablemente menores para mantener las células en suspensión. Los estudios realizados sobre el uso de estos reguladores hormonales vegetales son generosos y podrían revisarse ampliamente en la literatura (Roca y Mroginski, 1991).

#### **1.4 SUSPENSIONES CELULARES**

Las suspensiones de cultivos celulares es un conjunto de células indiferenciadas en forma libre o de agregados, distribuidos en medio de cultivo líquido homogéneo en constante agitación, empleado para mantener y propagar las células vegetales. Entre los usos de estas suspensiones se encuentra: estudios sobre el ciclo celular, estudios fisiológicos y bioquímicos, formación de metabolitos secundarios, aislamiento de mutantes y estudios de embriogénesis somática (Roca y Mroginski, 1991).

Una suspensión celular se prepara transfiriendo pequeños segmentos de callo friable a un medio de cultivo líquido agitado para su crecimiento y disgregación, con una buena biomasa celular activa y lo suficientemente abundante para alcanzar una buena densidad celular. La agitación es realizada mediante agitadores orbitales con el fin de ayudar a la dispersión de las células y favorecer el intercambio gaseoso; las velocidades que se manejan oscilan entre 30 y 150 r.p.m. dependiendo de la especie vegetal y el volumen de operación (Dixon, 1991).

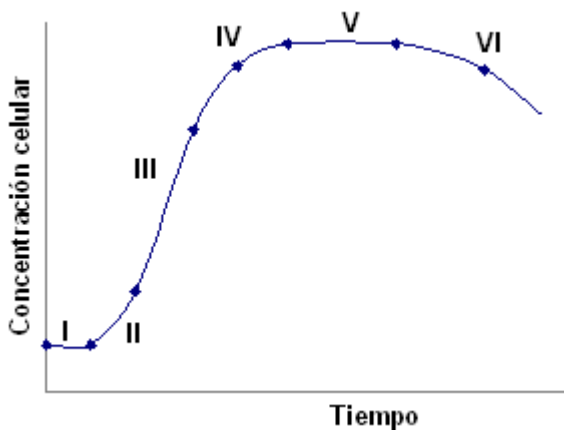
Para la formación de cultivos de células en suspensión normalmente es necesario un inóculo grande. Si el callo no es friable pocas células se desprenderán del callo y el tamaño del inóculo de células en suspensión puede no ser alcanzable. Cuando el nuevo cultivo de células en suspensión ha alcanzado una densidad adecuada para subcultivar, se remueve el material calloso no desprendido y los agregados celulares, utilizando una jeringa estéril, por filtración, permitiendo que el material más grande se sedimente y tomando con una pipeta la parte superior del cultivo, o simplemente vaciando directamente. Existe un tamaño mínimo de inóculo por debajo del cual las suspensiones no reanuden fácilmente el crecimiento activo luego de la transferencia y en algunos cultivos parte del crecimiento ocurre sobre la superficie de los pequeños agregados. La densidad mínima de células requeridas para el cultivo en suspensión depende de la tasa de crecimiento y de la composición del medio. Generalmente 10% de la densidad celular inicial al volumen total del cultivo será suficiente. La adición de medio en el cual la línea celular ha estado creciendo previamente (medio acondicionado) estimulará el crecimiento de las suspensiones celulares a baja densidad del inóculo. La tasa de crecimiento del cultivo a menudo se incrementará si las células son transferidas antes de que el cultivo alcance la fase estacionaria. (Franklin y Dixon, 1994).

### 1.4.1 Cinética de crecimiento celular

Para mantener una suspensión celular en crecimiento continuo, es necesario identificar el momento apropiado en que los componentes del medio de cultivo se agotan y deben ser renovados, así como remover las sustancias tóxicas excretadas por las células durante su metabolismo. Por tanto se hace necesario, bien sea, un subcultivo en medio fresco o un cambio de determinado volumen del medio de cultivo para continuar los procesos fisiológicos normales. La etapa apropiada puede ser determinada a partir de una curva de crecimiento celular con respecto al tiempo, que depende a su vez de la cantidad de inóculo utilizado para iniciar las suspensiones y de la composición del medio de cultivo.

La curva de crecimiento típica de células en suspensión presenta las siguientes fases, (Figura 2):

**Figura 2.** Fases del crecimiento celular. I Latente, II Aceleración, III Exponencial, IV Desaceleración, V Estacionaria, VI Muerte.



Dependiendo de la especie, la mayoría de los cultivos de células vegetales en suspensión alcanzan su máxima densidad celular entre 18 y 25 días, aunque

puede haber cultivos bastante activos, que la alcanzan entre los 6 y 25 días (Hurtado 1988).

#### **1.4.2 Métodos para medir el crecimiento de las células en suspensión**

Los métodos más utilizados para determinar la concentración o el crecimiento de las células vegetales en suspensión según Roca y Mroginski (1991) son:

- **Numero de células:** Es un parámetro de crecimiento de mucha utilidad en el cual se realiza el conteo de células. Sin embargo, como las células vegetales tienden a permanecer en agregados, es necesario separarlas tratándolas previamente con trióxido de cromo acuoso al 8% entre 2 y 15 min a 70 °C ó pectinasa al 0.1% por 16 h a 25 °C.
- **Volumen celular:** Consiste en tomar un volumen conocido de suspensión en un tubo cónico graduado, se centrifuga durante 3 minutos a 200 r.p.m y luego se separa del filtrado. La concentración se expresa como el volumen del “pellet” por volumen de la muestra del cultivo.
- **Peso fresco:** Sobre un papel de filtro previamente pesado se colocan las células lavadas con agua destilada, se filtran al vacío y se pesan
- **Peso seco:** Se procede de igual forma que para el peso fresco y posteriormente se secan a 60° C durante 24 horas y se pesan nuevamente. Este método no es recomendable para pequeñas cantidades de células.
- **Turbidez:** Este método aplica a suspensiones celulares que crecen en frascos provistos de brazo lateral. El número de células es proporcional a la turbidez del cultivo y esta se puede medir con un espectrofotómetro con filtro azul entre longitudes de onda de 400-465nm.

- Viabilidad celular: Son técnicas utilizadas para determinar la viabilidad de las células en cultivo. El método más empleado es la tinción con el azul de Evans, mediante el cual se tiñen las células viables. Otras formas de tinción usan diacetato de fluoroceína o sales de tetrazolio, según el protocolo establecido.
- Índice Mitótico (IM) Método utilizado para determinar el número de núcleos en mitosis por el total de células en el cultivo  $(IM = \frac{células.en.mitosis}{total.de.células} \times 100)$ , el número mínimo de células analizadas debe ser de 100.

### 1.4.3 Características de las suspensiones

Normalmente, los cultivos de células en suspensión son heterogéneos en las formas celulares ya que contienen tanto células libres como agregados celulares. La proporción entre ambos, así como su tamaño, dependen de la especie vegetal, edad del tejido en cultivo, composición del medio y condiciones de crecimiento (Habeych 2003).

El tamaño promedio de las células en suspensión oscila entre 25 y 475  $\mu\text{m}$  dependiendo de su morfología. En las suspensiones celulares se encuentran dos tipos específicos de células:

**Células meristemáticas:** Son pequeñas células indiferenciadas con envoltura nuclear definida, núcleo grande que pueden ocupar alrededor de las tres cuartas partes del volumen total de la célula. Su forma varía entre isodiamétrica y cúbica y generalmente no poseen vacuola. No poseen plastidios, y el retículo endoplasmático, tanto liso como rugoso, es reducido, se mantienen en continua división.

Células parenquimáticas: Son células medianamente diferenciadas, de mayor tamaño que las meristemáticas, cuya forma oscila entre redondeadas o alargadas. Poseen plastidios, una vacuola grande y pared celular delgada o de mediano grosor que les permite el transporte de nutrientes a corta distancia.

Al observar al microscopio, las células en suspensión es posible encontrar mayor cantidad de células meristemáticas durante las primeras etapas de la cinética celular y luego células parenquimáticas en las etapas subsecuentes. Al final de la cinética, el tamaño de éstas tiende a aumentar debido a la vacuolización y la síntesis de sustancias, característica predominante de las células adultas (Roca y Mroginski, 1991).

## **1.5 METABOLITOS SECUNDARIOS**

Los productos naturales, llamados metabolitos secundarios, son compuestos generalmente de bajo peso molecular, restringidos con frecuencia a familias o a géneros especiales de plantas. No son importantes para el metabolismo primario de la planta, pero en muchos casos son de gran importancia para la supervivencia de la planta en su ambiente; generalmente se forman después de que el crecimiento ha cesado (fase estacionaria) de allí que una de las estrategias utilizadas es el cultivo en dos fases, una para el crecimiento y otra para la producción.

## **1.6 INDUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS**

Para que las técnicas de cultivo de células vegetales lleguen a ser económicamente viables, es importante desarrollar métodos que permitan la obtención de cantidades apreciables de los compuestos útiles de las células cultivadas en suspensión. Hasta este momento, varias estrategias se han desarrollado para mejorar la producción de metabolitos secundarios con el empleo

de células vegetales. Las células del cultivo de tejidos acumulan normalmente grandes cantidades de compuestos secundarios solamente bajo condiciones específicas. Eso significa que la maximización de la producción y de la acumulación de metabolitos secundarios por las células cultivadas de tejidos vegetales requiere la manipulación de los parámetros del ambiente y el medio de cultivo, seleccionar líneas celulares de alta producción, el medio precursor alimenticio y la elicitación.

Numerosas investigaciones han sido realizadas para estudiar el efecto de algunos factores físicos y químicos tales como el pH, concentración de los nutrientes en el medio de cultivo, empleo de fitohormonas, temperatura, aireación, luz y agitación, sobre el crecimiento de células en suspensión y la producción de metabolitos secundarios (Bourgaud et al., 2001) en diferentes especies vegetales; específicamente se ha estudiado el efecto de algunos de los factores mencionados anteriormente en *Nerium oleander* (Ibrahim et al., 2009).

Aunque la mayoría de los factores mencionados han sido exitosos para mejorar y aumentar la producción de metabolitos secundarios en diferentes especies vegetales, los mejores resultados obtenidos para la transformación de plantas superiores, especialmente de *Nerium oleander*, es el derivado del mecanismo inductor de tumores de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* (Ibrahim et al., 2007). Los cultivos de células u órganos transformados tienen el potencial de incrementar la producción de metabolitos secundarios.

### **1.6.1 Selección de células de alta producción**

El cultivo de células vegetales representa una población heterogénea donde las características fisiológicas de las células de la planta son diferentes. La síntesis de varios productos en altas cantidades usando la selección y la investigación de



cultivos de células vegetales han sido descritos ampliamente en la literatura (Bourgau et al, 2001). Los métodos de clonación de células pueden proporcionar líneas celulares de alto rendimiento del producto. Una cepa de *Euphorbia milli* acumuló alrededor de siete veces el nivel de antocianinas producidos por el cultivo parental después de 24 selecciones (Yamamoto et al., 2001). Yamada y Sato (1981) emplearon el cultivo de células de *Coptis japonica*, donde se observó un crecimiento rápido del cultivo y una producción alta de berberina en un biorreactor de 14 L. La línea celular seleccionada se incrementó alrededor de 6 veces en 3 semanas y se produjo la cantidad más alta de alcaloide, 1.2 g/l de medio, y la cepa fue muy estable, produciendo un alto nivel del berberina incluso después de 27 generaciones. Fueron divulgados incrementos de capsaicina y ácido rosmarínico en las líneas celulares PFP de *Capsicum annuum* (Salgado y Ochoa, 1990).

### **1.6.2 Manipulación de nutrientes para incrementar el rendimiento**

El trabajo más exhaustivo en mejorar la producción de un compuesto vegetal de interés consiste principalmente en determinar el mejor medio de cultivo. En esta optimización del medio de cultivo la adición de compuestos orgánicos, minerales, fuentes de nitrógeno y fósforo, fuente de carbono y especialmente hormonas o reguladores de crecimiento es muy importante, porque de acuerdo a su concentración se establece el balance entre los mecanismos de diferenciación y desdiferenciación celular (Bourgau et al, 2001). En algunos casos es importante realizar el cultivo en dos fases; una primera fase consistente en alcanzar el medio de cultivo óptimo para el crecimiento celular y una segunda fase para optimizar la producción del metabolito de interés (Roca y Mroginski, 1991). En cultivo de suspensiones celulares de *Taxus baccata*, en la primera fase del medio de cultivo optimizado el crecimiento celular se incrementó hasta 5.6 veces respecto al medio control (B5 sin modificar) y en la segunda fase en otro medio de cultivo optimizado la producción de taxol se incrementó 16 veces más respecto al medio de control. También es importante analizar la relación en que se encuentran varios de los

constituyentes del medio de cultivo, como por ejemplo la relación entre las fuentes de nitrógeno (nitrato/amonio) o la relación hormonal auxina/citoquinina.

### **1.6.3 Precursor alimenticio**

La fuente exógena de un precursor biosintético al medio de cultivo puede también aumentar la producción del producto deseado. Esto es útil cuando los precursores son baratos. El concepto se basa en la idea que el compuesto, que está en el intermedio o al principio de una ruta biosintética del metabolito secundario, permita una buena oportunidad de aumentar la producción del producto final. Las tentativas de inducir o de aumentar la producción de los metabolitos secundarios de la planta por suministro de precursores o compuestos intermediarios, han sido eficaces en muchos casos (Moreno et al., 1993). Por ejemplo, los aminoácidos se han agregado a los medios de cultivo de células en suspensión para la producción de alcaloides tropanoides de alcaloides indólicos. La adición de fenil-alanina a cultivos de células en suspensión de *Salvia officinalis* estimuló la producción del ácido rosmarínico. El ácido ferúlico de alimentación a cultivos de *Vanilla planifolia* dio lugar al aumento en la acumulación de la vainillina. Además, la adición de leucina, condujo al realce de monoterpenos volátiles en cultivos de *Perilla frutiscens*, al igual que la adición de geraniol a cultivos de células de rosa condujo a la acumulación del nerol y del citro-nellool (Roca y Mroginski, 1991). La utilización de colesterol y progesterona aumentó hasta 24 veces la producción de oleandrina en cultivos de suspensiones celulares de *Nerium oleander* L (Ibrahim et al., 2009).

### **1.6.4 Elicitación**

De todas las manipulaciones disponibles, la que resulta en un dramático incremento de productividad es la elicitación. Los elicitores son compuestos que inducen un cambio en el metabolismo de la célula vegetal, generalmente alteran la

producción de metabolitos secundarios como respuesta al estrés generado por el elicitor.

Los elicitores pueden ser agrupados en tres categorías:

Elicitores bióticos los cuales son moléculas derivadas de microorganismos que estimulan el metabolismo secundario e incluyen polisacáridos, glicoproteínas, compuestos orgánicos de bajo peso molecular y paredes celulares de hongos y bacterias.

Elicitores abióticos, tales como radiación ultravioleta, sales de metales pesados y varios químicos.

Elicitores endógenos, los cuales son químicos producidos dentro de la célula como mensajeros secundarios (v. gr. metil jasmonato)

Muchos de los metabolitos inducidos por elicitación están involucrados en la defensa de la planta y el éxito puede ser limitado para metabolitos no relacionados con la defensa de la planta. Así, la aplicación exitosa de la elicitación puede ser desafiante y requiere intensos procedimientos de ensayo y error. La elicitación no sólo mejora la producción, sino que también puede resultar en una nueva producción en casos donde no existía. De acuerdo con Whitehead et al. (1988), la elicitación es probablemente el único método para producir algunos químicos en las plantas. La elicitación también resulta en tasas incrementadas de acumulación, reduciendo así los tiempos totales de cultivo requeridos para obtener el producto. La elicitación puede también ser acoplada con otras técnicas de mejoramiento del rendimiento. Moreno et al. (1993) reportan el empleo de un precursor junto con la elicitación para mejorar los rendimientos de alcaloides indólicos de *Catharanthus roseus*. La elicitación también ha sido combinada con recuperación del producto *in situ* para incrementar los rendimientos. Otra ventaja

de la elicitación es la habilidad para manipular la calidad del producto, es decir, para alterar los perfiles de producción de los diversos fitoquímicos, mediante el uso de mezclas de elicitores.

En muchos sistemas de cultivo, la respuesta al elicitor también depende de la fase de crecimiento. Con pocas excepciones, muchos cultivos de células vegetales responden a la elicitación sólo durante la fase de crecimiento exponencial y el tiempo al cual el elicitor es adicionado.

El metil jasmonato ha sido reportado como un elicitor muy exitoso. Una combinación de metil jasmonato y elicitor de hongos ha mostrado un efecto sinérgico sobre la producción de metabolitos secundarios (Khosroushahi et al., 2006).

Los jasmonatos juegan un papel importante en la cascada de señal intracelular que comienza con la interacción de una molécula de elicitor con la superficie de la célula vegetal, en la acumulación de compuestos secundarios. Se ha demostrado que preparaciones de paredes de levadura, antibióticos bacterianos, oligourónidos derivados de paredes de células vegetales, quitosano derivado de paredes de células de hongos y una variedad de otros estímulos conducen a la rápida síntesis de JA endógeno (Muller, 1997). Este a su vez activa genes de defensa, conduciendo eventualmente a una variedad de proteínas y metabolitos antibióticos secundarios. Las proteínas inducidas se agrupan en diferentes categorías, algunas son proteínas defensivas tales como inhibidores de proteasas y enzimas proteolíticas; otras están involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios defensivos. Así mismo se ha identificado que una variedad de proteínas inducidas están asociadas con la ruta de transducción de señal, entre ellas lipoxigenasa y calmodulina. Los jasmonatos son sintetizados a partir de ácido linolénico (Zhao et al., 2005).

Se ha demostrado que el ácido jasmónico y el metil jasmonato fueron intermediarios en la ruta de transducción de señal y que 36 líneas celulares probadas, provenientes de diferentes especies respondieron al tratamiento con metil jasmonato incrementando la producción de metabolitos secundarios entre 9 a 36 veces (Zhao et al., 2005). El metil jasmonato es volátil, relativamente barato e idealmente adecuado para aplicarlo en reactores a gran escala.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GENERAL

Establecer el cultivo de células en suspensión de *Nerium oleander* y evaluar la producción de metabolitos secundarios a escala de matraz.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de las concentraciones de 2,4-D y quinetina en un medio de crecimiento sobre el establecimiento de callos y cultivos de células en suspensión.
- Establecer la curva de crecimiento de las células en suspensión
- Evaluar la eventual producción de metabolitos de interés durante las distintas fases del crecimiento.
- Determinar el efecto del metil jasmonato como elicitador sobre la producción de los metabolitos de interés por las células libres en suspensión.

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES**

Para la obtención y siembra de explantes, formación de callos, generación de suspensiones y el proceso de elicitación con metil jasmonato, se utilizó el procedimiento para mantener el nivel de asepsia adecuado establecido por el Laboratorio.

#### **3.2 INDUCCIÓN Y MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE CALLOS**

##### **3.2.1 Obtención y siembra de explantes**

Los explantes fueron obtenidos de hojas jóvenes de un arbusto de *Nerium oleander* completamente sano, que no presenta lesiones de patógenos externos. El material vegetal seleccionado, ubicado en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, fue trasladado al laboratorio y se sometió al procedimiento de desinfección respectivo.

##### **3.2.2 Formación de callos**

El diseño experimental empleado para el establecimiento de callos (Tabla 2), es un modelo de dos factores fijos completamente aleatorio, tres niveles y cinco observaciones (hormonas vegetales: auxina 2,4-D, 0.1, 1.5, 3.0 ppm y citoquinina quinetina, 0.1, 0.5, 1.0 ppm) para un total de 45 unidades experimentales. En cada unidad experimental se sembraron cuatro muestras de explantes, de tal forma que la variable de respuesta era el porcentaje de formación de callos friables: ningún explante formaba callo, 0%, uno formaba callo, 25%, dos formaba callo, 50%, tres formaba callo, 75% y los cuatro formaban callo, 100%.

**Tabla 2.** Diseño experimental para la etapa de callogénesis

<b>Factor</b>	<b>Concentración (ppm)</b>		
2,4-D	0.1	1.5	3.0
Quinetina	0.1	0.5	1.0

El medio de cultivo basal utilizado fue el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), con una concentración de 30 g/l de sacarosa como fuente de carbono y solidificado con agar con una concentración de 8 g/l, esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120°C y 15 psi. El medio fue complementado con una combinación de hormonas de acuerdo con el diseño experimental propuesto. El procedimiento seguido en la preparación de medios de cultivo semisólido para la formación de callos, fue el reportado por Roca y Mroginski (1991).

Después de haber obtenido los explantes se procedió a sembrarlos en frascos de 100 ml conteniendo cada uno 20 ml de medio. Una vez sembrados los explantes, los frascos se taparon con papel aluminio y vinilpel y se rotularon con la fecha de siembra y el medio de cultivo usado. Los frascos fueron expuestos a temperatura ambiente (18-20°C) en cuarto oscuro y sometidos a revisión visual periódica para establecer la formación de callos friables y posibles contaminaciones.

Los callos formados se subcultivaron cada 15 días en el mismo medio y condiciones de los explantes. Se realizaron al menos 3 subcultivos de callos antes de proceder a iniciar el establecimiento de las suspensiones celulares.

### **3.3 ESTABLECIMIENTO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES**

Para esta etapa, el diseño experimental fue semejante al de formación de callos (Tabla 3): dos factores fijos, tres niveles y tres observaciones (hormonas



vegetales: auxina 2,4-D, 0.1, 1.5, 3.0 ppm y citoquinina quinetina, 0.1, 0.5, 1.0 ppm) donde la variable de respuesta es el crecimiento celular.

**Tabla 3.** Diseño experimental para el establecimiento de suspensiones

Factor	Concentración (ppm)		
2,4-D	0.1	1.5	3.0
Quinetina	0.1	0.5	1.0

Las suspensiones celulares se prepararon por transferencia de una porción de 5 g de callo friable a un matraz erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo, suplementado con los niveles de hormonas de acuerdo al modelo experimental, en forma análoga y similar al proceso para la formación de callos. Las suspensiones celulares fueron mantenidas en agitador rotatorio a 120 rpm y sometidas regularmente a inspección visual para determinar posibles contaminaciones y otros problemas. Las células en suspensión fueron subcultivadas cada 20 días, por adición de 30 ml de suspensión decantada a 70 ml de medio fresco y mantenidas en las mismas condiciones de la suspensión original. Cuando el nuevo cultivo de células en suspensión alcanzó una densidad adecuada, se procedió a remover el material calloso no desprendido y los agregados celulares, vaciando directamente y filtrando en un tamiz de acero inoxidable malla 40 (tamaño de abertura 0.42 mm).

### **3.4 DETERMINACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO**

Para determinar la curva de crecimiento de las sus suspensiones celulares, se prepararon de acuerdo al mejor resultado obtenido de la combinación hormonal de las suspensiones hechas previamente, partiendo de 5 ml de solución concentrada en 20 ml de medio fresco contenidos en erlenmeyers de 100 ml, mantenidos a 120 rpm, temperatura ambiente y fotoperíodo luz día. Se utilizaron suspensiones que llevaban al menos 3 subcultivos para dar tiempo a las células de adaptarse a las

nuevas condiciones. Se tomaron muestras de 1 ml por triplicado cada 2 días y se determinó la biomasa por peso seco según el método descrito por Mills y Lee (1996), hasta alcanzar la fase estacionaria.

### 3.5 ESTUDIO DE ELICITACIÓN

Se estudió el efecto que podría tener el metil jasmonato (MeJ) sobre la producción de peruvósido y betulina por células de *Nerium oleander* cultivadas en suspensión en el medio previamente seleccionado. Para la observación de tal efecto, se tomaron dos factores (concentración del elicitor y el momento de su adición), cada uno con los niveles que se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Diseño experimental para el estudio del efecto elicitor de MeJ

<b>Tiempo de Aplicación (días)</b>	0	3	9
<b>Concentración del elicitor (ppm)</b>	1	1	1
	10	10	10
	100	100	100

Se utilizó MeJ marca Sigma de 99% de pureza. Se cultivaron 12 suspensiones iniciadas con 5.0 ml de solución concentrada en 20.0 ml de medio fresco, provenientes de suspensiones obtenidas a temperatura ambiente en fotoperiodo luz día a 120 rpm. El cultivo fue mantenido por 15 días. Se tomaron muestras cada 3 días por triplicado (total 168) para su respectivo análisis en HPLC para determinar la eventual producción de betulina y peruvósido a partir del día de adición del MeJ. El procedimiento del muestreo se detalla en la Tabla 5.

La adición del elicitor se hizo de la siguiente forma:

En el día cero se tomaron cuatro suspensiones; a tres de éstas se les adicionó una concentración de metil-jasmonato distinta (1, 10 y 100 ppm) y la cuarta fue el

control (sin MeJ). El tercer día (mitad de la fase exponencial) se tomaron cuatro suspensiones y de igual forma a tres de éstas se les adicionó MeJ al 1, 10 y 100 ppm respectivamente y la cuarta fue el control. Finalmente al noveno día (inicio de la fase estacionaria) se procedió de igual forma a la descrita anteriormente.

**Tabla 5.** Muestras del diseño de elicitación

Día de adición del MeJ	Concentración MeJ (ppm)	Día de muestreo					
		0	3	6	9	12	15
Día 0	0						
	1						
	10						
	100						
Día 3	0						
	1						
	10						
	100						
Día 9	0						
	1						
	10						
	100						

### 3.6 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Para determinar la eventual presencia de los metabolitos secundarios betulina y peruvósido en los sobrenadantes de las suspensiones celulares de *Nerium oleander*, se realizó el análisis por HPLC de betulina descrito por Zhao y colaboradores (2007) y de peruvósido descrito por Kyerematen y colaboradores (1985).

Las características de los métodos de HPLC usados para la determinación de estos compuestos se detallan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Métodos analíticos por HPLC para metabolitos de Nerium oleander

<b>Metabolito</b>	<b>Solventes</b>	<b>Rata (ml/min)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Detección</b>
Betulina	Acetonitrilo/ Agua (86:14)	1*	25*	UV 210
Peruvósido	Acetonitrilo/Agua (3:7)	0.5	25	UV 220

\*Valores no reportados en la literatura, asumidos en este trabajo.

Del sobrenadante de las suspensiones celulares se tomó 1,00 ml de solución, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 2500 g durante 15 minutos, filtradas con microfiltros de 0.2  $\mu\text{m}$  y luego utilizadas en el análisis por HPLC en un equipo marca Agilent Serie 1100.

Los métodos utilizaron una columna ZORBAX SB-C18 (3x100 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) para betulina y una columna LiChrospher® 100RP-18 (4x250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) para peruvósido.

## **4 RESULTADOS Y ANÁLISIS**

### **4.1 OBTENCIÓN Y SIEMBRA DE EXPLANTE**

Después de aplicar los protocolos de desinfección y siembra de explantes (concentración de etanol 70%, concentración de hipoclorito 3% y los tiempos de exposición 2 y 5 minutos respectivamente) no se presentó contaminación durante los dos primeros días después de la siembra. Tampoco se presentó contaminación endógena, debido probablemente a que las muestras se tomaron de hojas recién germinadas, delgadas y aparentemente sanas. Sin embargo, ya que el tiempo de exposición de las muestras vegetales al hipoclorito fue elevado, al final algunas de ellas presentaron necrosamiento (6.7%). Una concentración alta de hipoclorito y un tiempo de exposición considerable del explante a este producto, resultaría ser muy sensible para las células de la planta y en algún momento producir su muerte (Doods et al., 1995).

De acuerdo con estos resultados, no es necesario implementar el cultivo de plántulas *in vitro*, procedimiento recomendado cuando se presenta dificultades en la siembra de explantes, por contaminación endógena (Dixon y González, 1994).

### **4.2 ESTABLECIMIENTO DE CALLOS**

En las muestras donde se logró la formación de callos, se empezaron a observar pequeñas estructuras nodulares alrededor de los explantes a partir de la primera semana. Después de 15 días la cantidad de callos formados era aproximadamente constante. Los resultados obtenidos de acuerdo al porcentaje de formación de callos se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Porcentaje de formación de callos según la combinación de los reguladores de crecimiento quinetina y 2,4-D.

		Quinetina														
		0,1				0,5				1						
2,4-D	0,1	0	0	25	50	0	0	0	0	0	0	0	25	25	0	0
	1,5	50	75	75	75	75	75	100	75	100	100	25	50	75	50	25
	3,0	100	100	75	100	100	25	0	75	75	75	0	25	75	50	0

Una vez formados los callos, se seleccionaron los menos compactos (friables) y se cultivaron nuevamente en medio fresco. Después de 3 subcultivos la formación de callos observados (Fotografía 2) eran de color blanco, crecimiento rápido, textura blanda y consistencia friable, característica de las células vegetales desdiferenciadas por ser grandes y poseer vacuolas de gran tamaño, adecuadas para el establecimiento de suspensiones celulares (Serrano y Piñol, 1991).

**Fotografía 2.** Callos de *Nerium oleander* formados durante 4 semanas después de 3 subcultivos.



Los callos friables obtenidos se transfirieron al medio líquido MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento para luego proceder al trabajo experimental con las suspensiones celulares.

Los análisis estadísticos con el modelo R para el estudio de la combinación hormonal del experimento diseñado, mostró que los reguladores de crecimiento 2,4-D y quinetina tuvieron un efecto significativo sobre la formación de callos y los niveles de concentración utilizados muestran una interacción significativa entre los dos reguladores (para un nivel de significancia 0.05) (Tabla 8); por lo tanto no se puede generalizar un punto óptimo único de la combinación 2,4-D y quinetina sobre la formación de callos. Sólo se obtuvieron varias combinaciones donde la respuesta sobre la formación de callos fue alta.

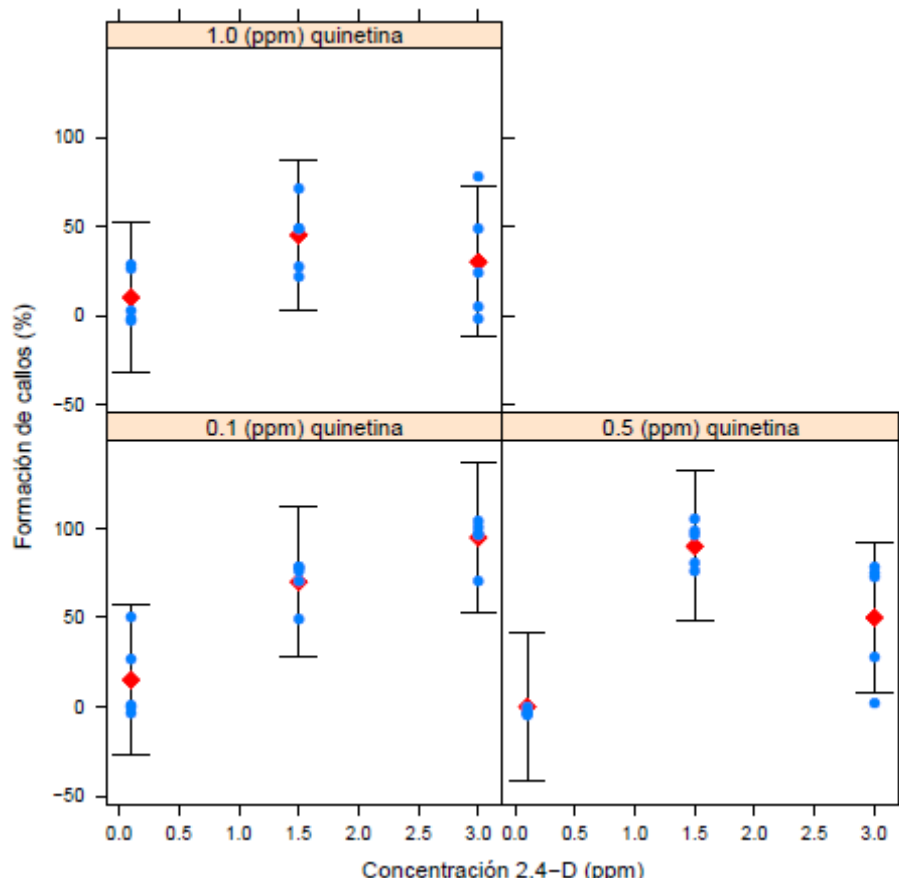
**Tabla 8.** Análisis de varianza para la formación de callos de *Nerium oleander*

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	31000	2	15500	36	2,58117E-09	3,3
Columnas	7583	2	3792	8,8	0,000770189	3,3
Interacción	9167	4	2292	5,3	0,001794167	2,6
Dentro del grupo	15500	36	431			
Total	63250	44				

Al realizar un análisis más detallado, cuando la concentración de 2,4-D varía de 0.1 ppm a 1.5 ppm, el porcentaje de formación de callos aumenta y se observa una baja interacción para los tres niveles de quinetina; sin embargo, al aumentar la concentración de 2,4-D de 1.5 ppm a 3.0 ppm, la interacción es muy fuerte y no se puede reportar cómo afecta este incremento la formación de callos.

Así mismo, al aumentar la concentración de quinetina de 0.1 ppm a 1.0 ppm, se observa una marcada interacción y el comportamiento para la formación de callos va a depender de la concentración de 2,4-D del medio de cultivo (Figuras 3 y 4).

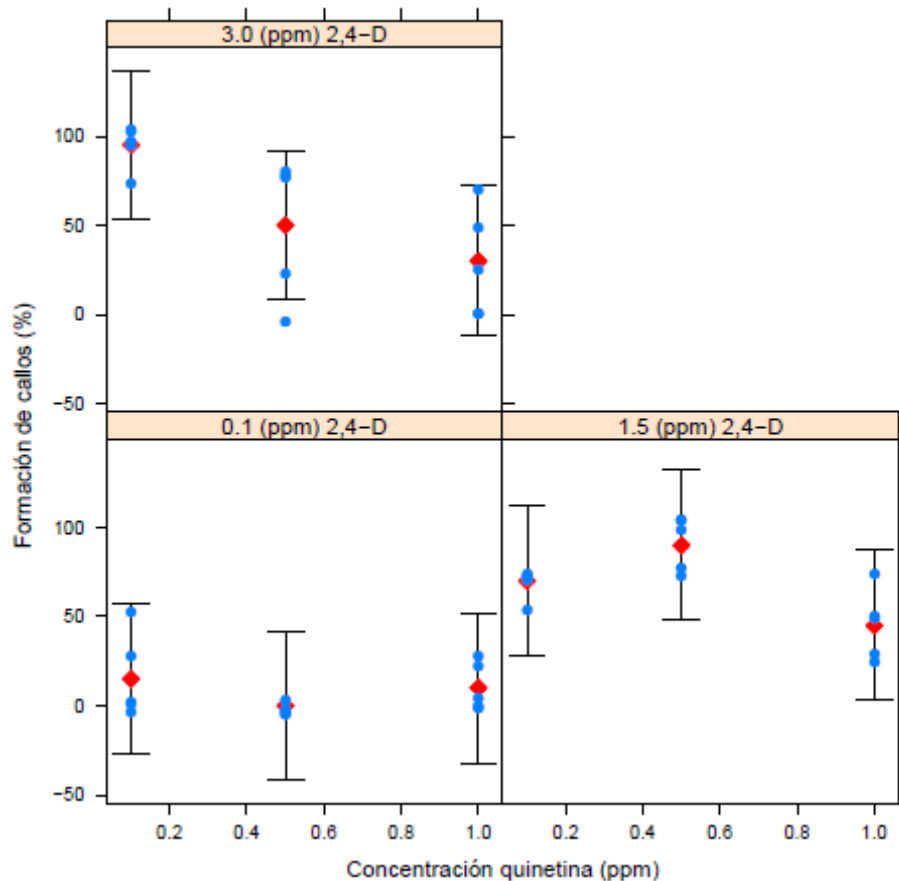
**Figura 3.** Porcentaje de formación de callos de *Nerium oleander* durante cuatro semanas, en función de la concentración de la auxina 2,4-D (0.1, 1.5, 3.0 ppm), para los tres niveles de la citoquinina quinetina, intervalo de confianza de 95%.



El experimento muestra dos combinaciones de los reguladores de crecimiento quinetina y 2,4-D, donde el porcentaje de formación de callos obtenidos es alto. La primera: 0.1 ppm de quinetina, 3.0 ppm de 2,4-D y la segunda: 0.5 ppm de quinetina, 1.5 ppm de 2,4-D.



**Figura 4.** Porcentaje de formación de callos de *Nerium oleander* a la semana cuatro, en función de la concentración de la citoquinina quinetina (0,1, 0,5, 1,0 ppm.), para los tres niveles de la auxina 2,4-D, intervalo de confianza de 95%.



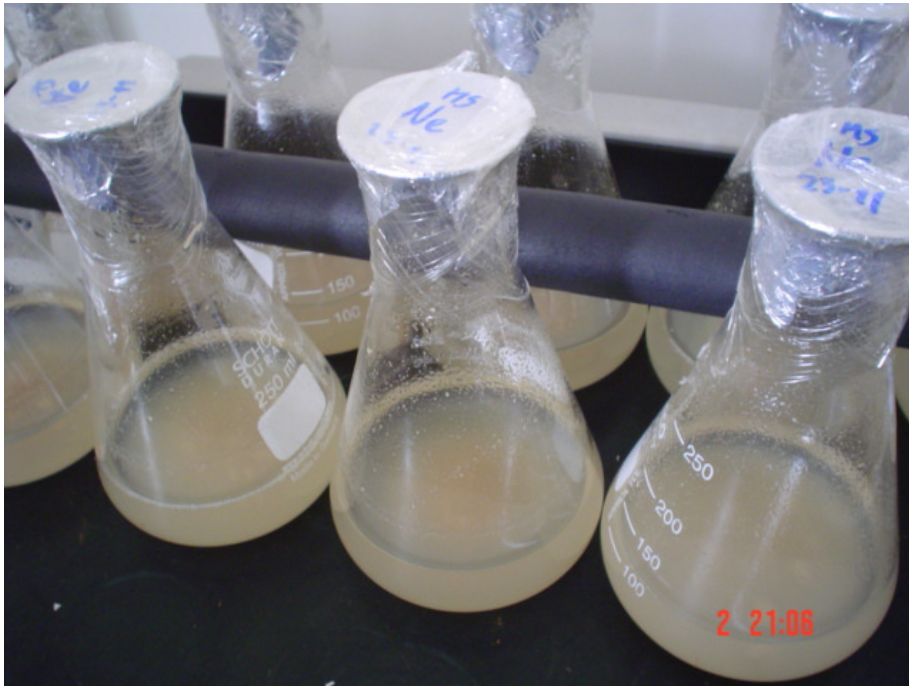
### 4.3 ESTABLECIMIENTO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES

#### 4.3.1 Etapa de disgregación

Luego de obtener los callos friables, éstos se transfirieron a un medio líquido sin reguladores de crecimiento. Una vez determinado un nivel adecuado de los reguladores de crecimiento para la obtención de callos, se subcultivaron las suspensiones celulares en un medio líquido con la concentración auxina 1.5 ppm, citoquinina 0.5 ppm. Se seleccionó este nivel de concentración hormonal ya que

los resultados obtenidos en el establecimiento de suspensiones celulares previos al diseño experimental, eran mejores. Las suspensiones se subcultivaron cada 15 días en medio fresco con los reguladores de crecimiento en los niveles seleccionados. Las suspensiones fueron filtradas cuando se presentaba producción de callos.

**Fotografía 3.** Suspensiones celulares de *Nerium oleander* después de ocho semanas de cultivo a una temperatura de 24°C, velocidad de agitación, 120 rpm y fotoperíodo luz día.



Después de ocho semanas de cultivo, las suspensiones celulares obtenidas (Fotografía 3) presentaron una forma apreciablemente redondeada, isodiámetrica, de buen aspecto, grandes y distribuidas homogéneamente en el medio líquido. En algunas regiones se observaron agrupaciones celulares tendientes a formar microcallos que posteriormente fueron separados por filtración. Esta característica es muy normal ya que las células tienden a volver al estado asociado del tejido vegetal inicial (Roca y Mroginski, 1991). Las suspensiones celulares obtenidas se

utilizaron para evaluar el modelo experimental con los reguladores de crecimiento (semejante al utilizado en callogénesis), donde la variable de respuesta es la concentración celular expresada como gramos de células/litro de suspensión.

#### 4.3.2 Estudio del efecto de la combinación hormonal

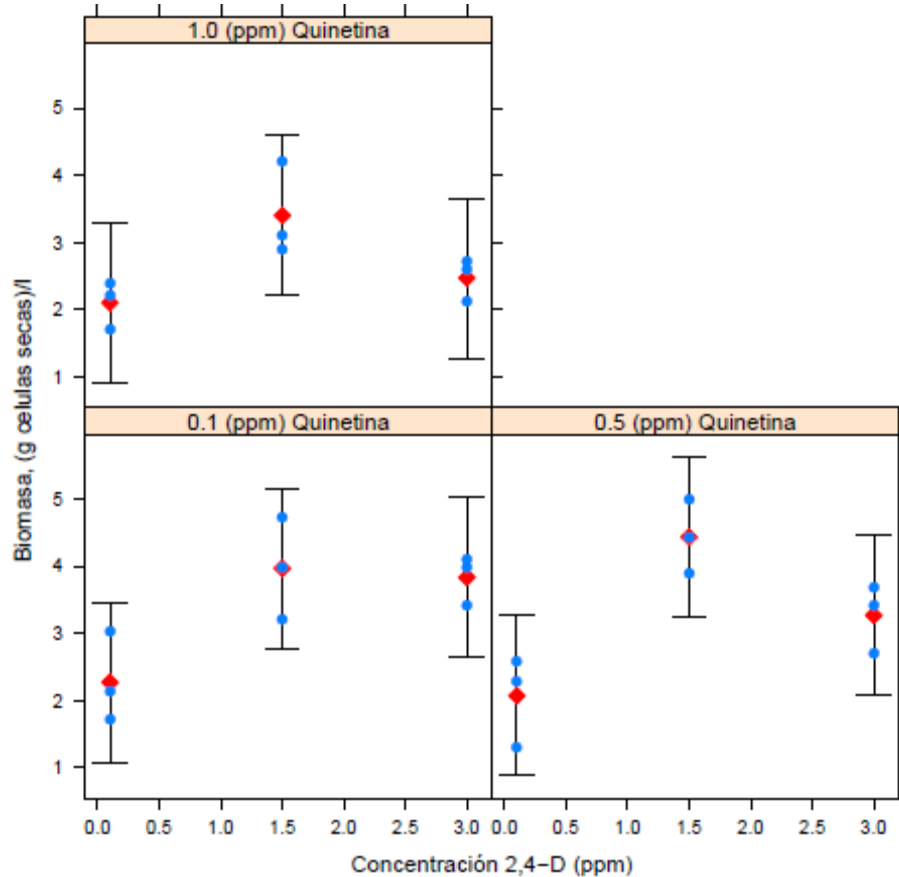
Una vez desarrollados los experimentos con las suspensiones celulares, se observó que no existe una interacción entre las hormonas y sus respectivos niveles evaluados (Tabla 9).

**Tabla 9.** Análisis de varianza para la concentración celular en fase estacionaria de células en suspensión de Nerium oleander

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Muestra	14,54	2	7,27	22,5	1,2582E-05	3,6
Columnas	2,58	2	1,29	4,0	0,037	3,6
Interacción	1,92	4	0,48	1,5	0,246	2,9
Dentro del grupo	5,81	18	0,32			
Total	24,85	26				

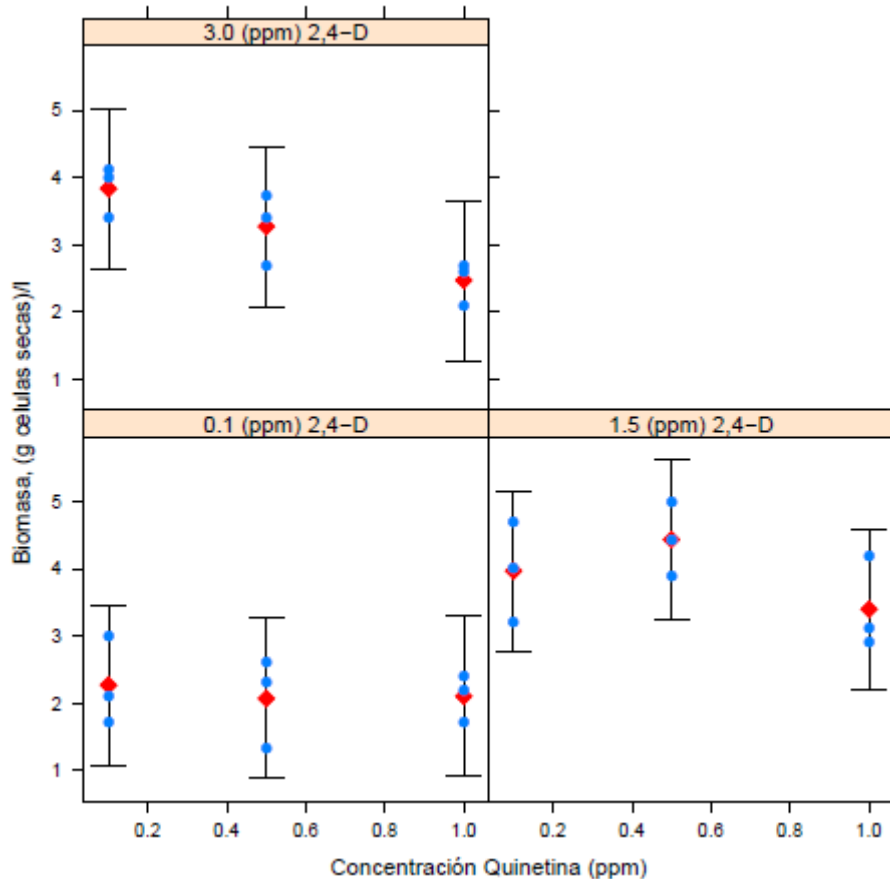
La concentración de células suspendidas en el medio varía notablemente al variar la concentración de 2,4-D pero cambia muy poco al variar la concentración de quinetina.

**Figura 5.** Concentración de células secas de *Nerium oleander* en función de la concentración de 2,4-D para los tres niveles de quinetina (0.1, 0.5, 1.0 ppm.), intervalo de confianza de 95%.



El experimento presentó un máximo en 0.5 ppm y 1.5 ppm de quinetina y 2,4-D, respectivamente. Este punto es igual al obtenido en calogénesis. Lo cual indica que los niveles de concentración de 2,4-D y de quinetina utilizados son adecuados para el crecimiento de las células de *Nerium oleander*. Como las variables son independientes (el efecto que pueda tener sobre el crecimiento celular la variación de la concentración de un regulador de crecimiento no depende del nivel concentración del otro regulador de crecimiento), se puede inferir que al aumentar la concentración de la auxina, aumenta el crecimiento celular, alcanzando un punto máximo en 1.5 ppm (Figuras 5 y 6).

**Figura 6.** Concentración de células secas de *Nerium oleander* en función de la concentración de quinetina para los tres niveles de 2,4-D (0.1, 1.5, 3.0 mg/l), intervalo de confianza de 95%.



El cambio observado en la concentración de células, cuando aumenta la concentración de quinetina, es significativo desde el punto de vista estadístico, pero muy pequeño desde el punto de vista práctico, por lo cual no es de interés.

#### 4.4 DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

La Figura 7 presenta los resultados del crecimiento de las células, de *Nerium oleander* cultivadas en suspensión en medio MS en las condiciones hormonales establecidas previamente (0.5 ppm y 1.5 ppm de quinetina y 2,4-D respectivamente). Se observó el crecimiento típico celular de cultivos vegetales

en suspensión, pero sin presencia de una fase lag ni de una fase de aceleración, debido probablemente a que las células ya están adaptadas al medio y en cuanto se subcultivan en medio fresco, inmediatamente comienza su crecimiento.

El modelo matemático que mejor se ajusta a los resultados es el correspondiente a la función logística. Este modelo se caracteriza por que en el crecimiento celular desdiferenciado, las células comienzan a dividirse y a crecer en forma exponencial mientras exista suficiente sustrato para hacerlo (medio de cultivo). Con el transcurrir del tiempo el medio nutritivo se va agotando, por lo tanto la división celular disminuye y la cinética de crecimiento comienza una etapa de desaceleración hasta que finalmente el número de células se estabiliza y la concentración celular permanece constante (fase estacionaria).

Una de las funciones logísticas que explican adecuadamente este comportamiento está dado por la ecuación de Verhulst (Ec. 1), la cual tiene una típica aplicación sobre el crecimiento poblacional en el cual la tasa de reproducción ( $\frac{dP}{dt}$ ) es proporcional a la población existente (P) y a la cantidad de recurso disponible (1 – P).

$$\frac{dP}{dt} = rP\left(1 - \frac{P}{K}\right) \quad (\text{Ec. 1})$$

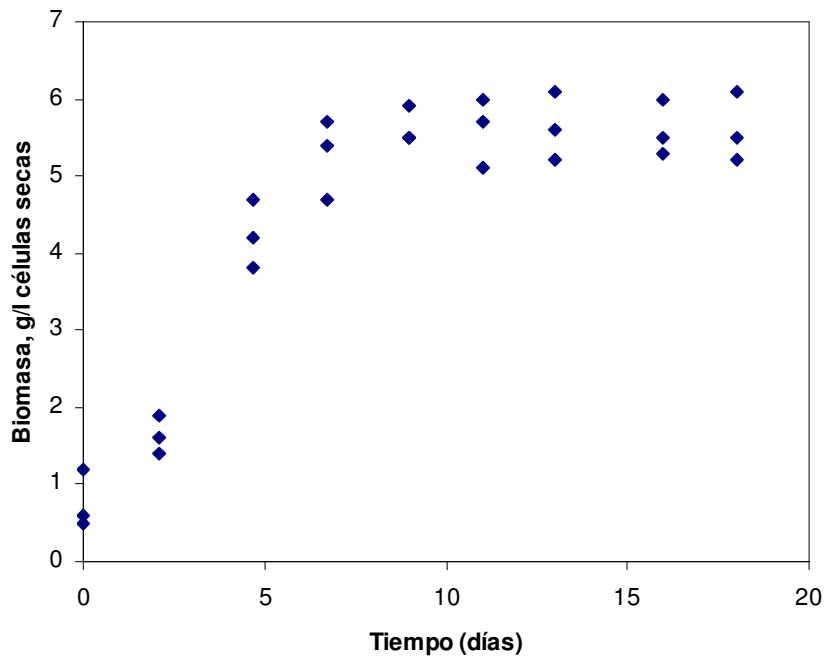
Donde:        r es la tasa de crecimiento  
                  K es la capacidad de persistencia.

La solución a esta ecuación diferencial es una función logística (Ec. 2), con una población inicial  $P_0$ .

$$P_{(t)} = \frac{kP_o e^{rt}}{k + P_o (e^{rt} - 1)} \quad (\text{Ec. 2})$$

Siendo:  $\lim_{t \rightarrow \infty} P_{(t)} = k$

**Figura 7.** Crecimiento de células en suspensión de *Nerium oleander*.

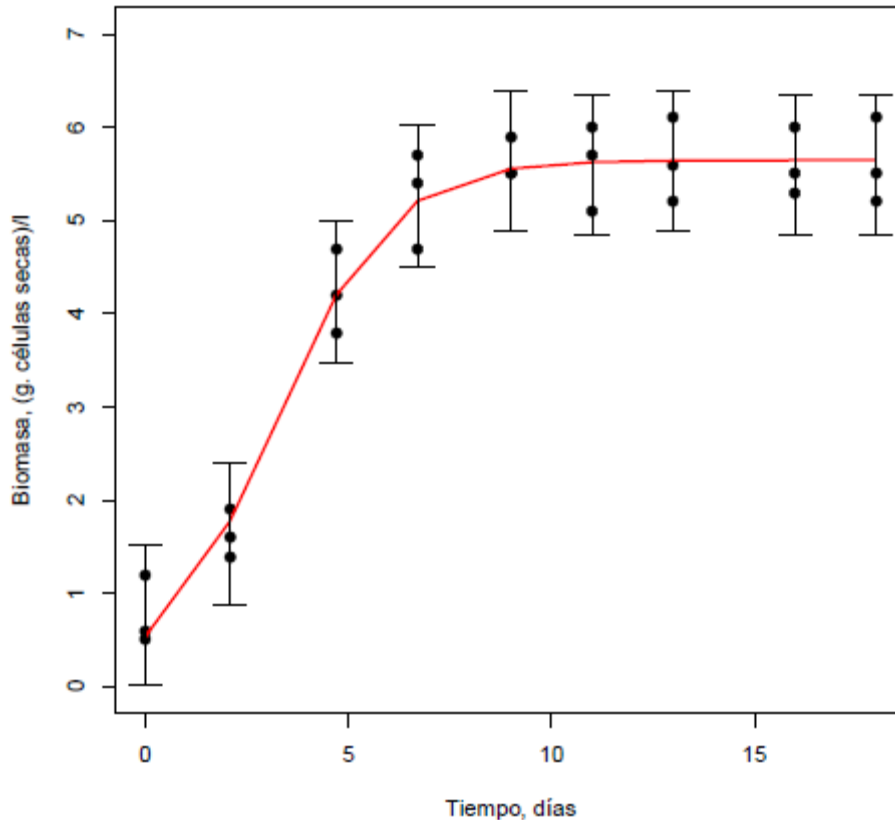


Tomando todos los puntos experimentales y correlacionándolos al modelo matemático de función logística (Figura 8), se obtiene el modelo que relaciona la concentración de células de *Nerium oleander* al variar el tiempo (Ec. 3).

$$X = \frac{5.647}{1 + e^{\frac{3.186-t}{1.417}}} \quad (\text{Ec. 3})$$

Siendo: X es el crecimiento celular en g/l  
t es el tiempo en días

**Figura 8.** Curva de crecimiento de células en suspensión de *Nerium oleander*, intervalo de confianza de 95%.



La curva presenta una fase de crecimiento exponencial aproximadamente de 5 días, una fase de desaceleración y una fase estacionaria a partir del décimo día. Para obtener el tiempo de duplicación se establece que la fase de crecimiento exponencial comienza en  $t = 0$  y se estima por tanteo y error cuando  $X = 2 X_0$  ( $x_0$  concentración inicial). Este valor corresponde a 1.14 días. Obteniéndose luego la

$$\text{velocidad máxima de crecimiento como } \mu_{\max} = \frac{\ln 2}{t_d} = 0.608.d^{-1}$$

El valor de  $\mu_m$  encontrado en este estudio para el crecimiento de células en suspensión de *Nerium oleander* es muy elevado comparado con algunos valores



calculados a partir de datos reportados en la literatura (Arias et al., 2009) como se indica en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Valores de velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_m$ ) para diferentes especies de células vegetales cultivadas en suspensión.

<b>Especie</b>	$\mu_m(d^{-1})^*$	<b>Referencia</b>
<i>Panax ginseng</i>	0.17	Wu <i>et al.</i> , 2005
<i>Taxus chinensis</i>	0.12	Dong y Zhong, 2002
<i>Coffea arabica</i>	0.06	Dubis <i>et al.</i> , 1995
<i>Morinda eliptica</i>	0.43	Abdullah <i>et al.</i> , 2000
<i>Datura stramonium</i>	0.17	Ballica <i>et al.</i> , 1993
<i>Catharanthus roseus</i>	0,45	Nef <i>et al.</i> , 1991
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	0.12	Miyasaka <i>et al.</i> , 1985
<i>Lavandula vera</i>	0.17	Georgiev <i>et al.</i> , 2004
<i>Rollinia mucosa</i>	0.10	Figueiredo <i>et al.</i> , 2000
<i>Thevetia peruviana</i>	0.17	Arias et al, 2009
<i>Nerium oleander</i>	0,61	Este estudio

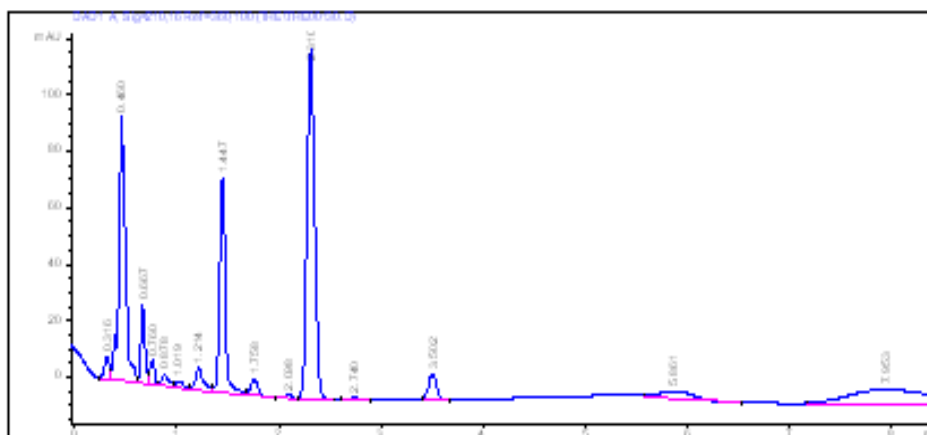
\*Valores calculados a partir de datos reportados en la literatura.

#### **4.5 ANÁLISIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS**

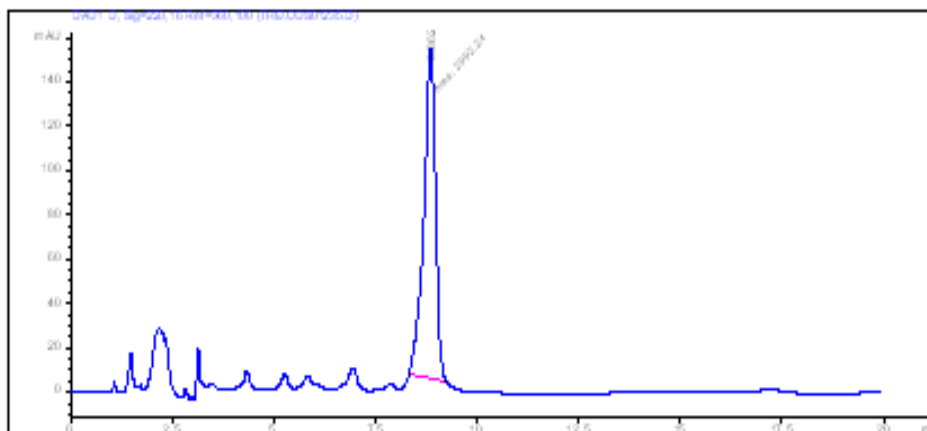
El análisis de HPLC para las muestras experimentales de los cultivos de suspensiones celulares se realizó en un equipo marca Agilent Serie 1100 bajo las condiciones registradas en la tabla 6. La solución de concentración 100 ppm. preparada a partir del estándar comercial de betulina (Figura 9), presentó un tiempo de retención de 2,3 minutos y se presentaron otros picos significativos cercanos a éste, debidos probablemente a la presencia de compuestos de

estructura similar. La solución de concentración 100 ppm. del estándar comercial de peruvósido (Figura 10), presentó un tiempo de retención de 8,9 minutos.

**Figura 9.** Cromatograma del estándar de betulina con una concentración de 100 ppm.



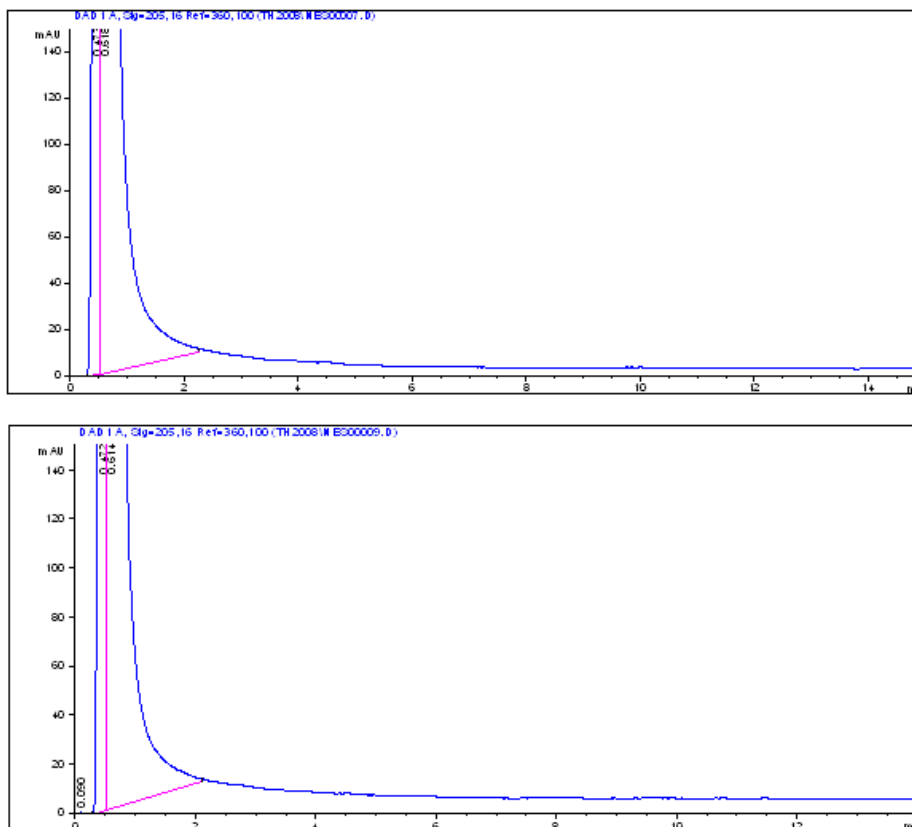
**Figura 10.** Cromatograma del estándar de peruvósido con una concentración de 100 ppm.



Los cromatogramas obtenidos de las muestras de los cultivos de suspensiones celulares de *N. oleander* no muestran producción de betulina y peruvósido, sin embargo, las muestras para el análisis de peruvósido presentaron pequeños picos

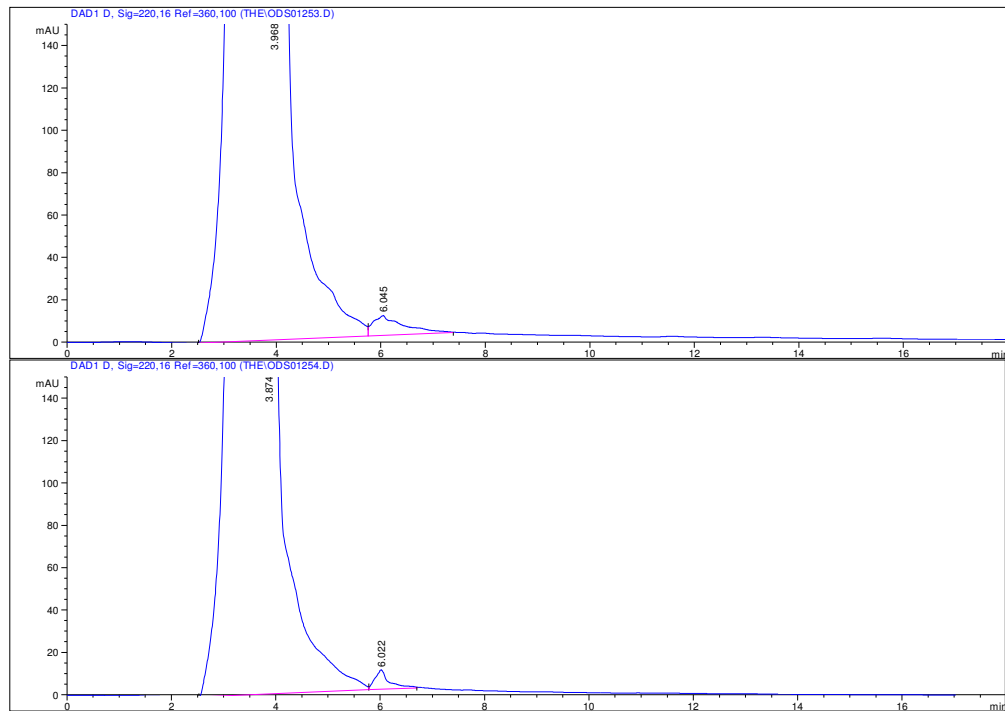
con tiempos de retención diferentes del estándar, indicando la presencia de compuestos sin identificar (Figuras 12 y 13).

**Figura 11.** Cromatogramas de HPLC obtenidos para el análisis de betulina de muestras de suspensiones celulares de *N. oleander*.

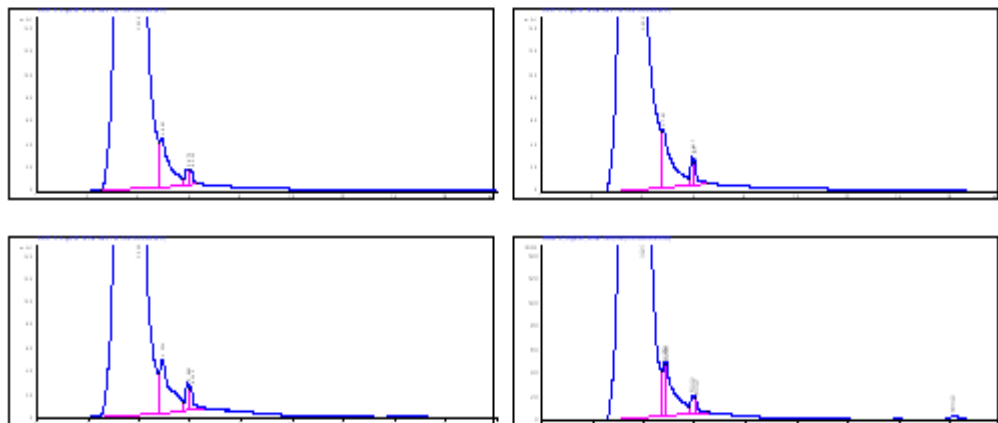


Respecto al comportamiento de los registros, se puede inferir que a pesar de no haber producción de betulina y peruvósido, si se observa producción de un compuesto al iniciar el crecimiento, como se observa en la figura 12, con un tiempo de retención de 6,0 minutos. Al tercer día, después de añadir el elicitor el día cero, se observó un nuevo pico (Figura 13), indicando la formación de un compuesto con tiempo de retención 4,8 minutos, lo cual da un indicio de efecto elicitor del MeJ.

**Figura 12.** Cromatogramas de HPLC obtenidos el día cero para el análisis de peruvósido sin adición de MeJ a cultivos de suspensiones celulares de *N. oleander*.



**Figura 13.** Cromatogramas de HPLC obtenidos en el día tres para el análisis de peruvósido con adición de MeJ en el día cero a los cultivos de suspensiones celulares de *N. oleander*.



#### 4.6 ESTUDIO DE ELICITACIÓN

Los análisis de HPLC realizados para la cuantificación de metabolitos secundarios en los cultivos celulares de *Nerium oleander* elicitados con metil jasmonato adicionados al cultivo los días 0, 3 y 9, no mostraron producción de peruvósido y betulina en ninguna de las muestras con y sin elicitor.

El metil jasmonato y en general los derivados del ácido jasmónico han sido utilizados para evaluar la incidencia que tienen sobre la producción de metabolitos secundarios (Zhao et al., 2005). Aunque varios casos reportados en la literatura son exitosos en inducir o mejorar la producción de metabolitos secundarios utilizando como elicitor el metil jasmonato: producción de taxol por *Taxus baccata* (Khosroushahi et al., 2006),  $\alpha$ -tocoferol en suspensiones celulares de *Helianthus annuus* L (Gala et al., 2005), ácido oleanólico en suspensiones celulares de *Caléndula officinalis* (Wiktorowska et al., 2009), entre otros, el presente estudio no mostró formación de peruvósido y betulina.

Respecto a la inhibición de la ruta metabólica por parte de los elicitores, se han encontrado reportes de inducción de fenilpropanoide, empleando extracto de levadura como elicitor en cultivos celulares de *Vainilla planifolia*, en los cuales no ha sido posible la inducción del metabolito secundario; no obstante, el mismo elicitor empleado en cultivos de *Thalictrum rugosum* presentó excelentes resultados para la inducción de alcaloides (Funk y Brodelius, 1990). Según lo anterior es posible que el MeJ haya inhibido la formación de metabolitos secundarios de células en suspensión de *Nerium oleander*.

## 5 CONCLUSIONES

Una correcta desinfección, eliminando la contaminación exógena y obteniendo un bajo porcentaje de necrosamiento en los cultivos de callos de explantes de *Nerium oleander*, se logró con un lavado previo de la hoja con detergente comercial, luego un enjuague con etanol al 70% durante 2 minutos y finalmente con una inmersión en hipoclorito al 3% durante 5 minutos.

Se lograron establecer cultivos *in vitro* de callos friables de *Nerium oleander* utilizando las concentraciones adecuadas de los reguladores de crecimiento 2,4-D y quinina. La auxina 2,4-D y la citoquinina quinina tuvieron un efecto significativo sobre la formación de callos friables de *Nerium oleander*. El medio basal MS, suplementado con 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y concentraciones de 3.0 mg.l<sup>-1</sup> de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.1 mg.l<sup>-1</sup> de quinina resultó ser un medio adecuado para la formación de callos friables y suspensiones celulares de *Nerium oleander*.

La formación de callos como producto de la variación de la concentración de la auxina 2,4-D y de la concentración de la citoquinina quinina, es más compleja que el diseño experimental realizado, debido a las interacciones, por lo tanto, no se puede determinar una combinación óptima de las concentraciones de las dos hormonas.

Se establecieron cultivos de células en suspensión de *Nerium oleander* a partir de cultivos *in vitro* de callos friables. Al aumentar la concentración de la auxina 2,4-D aumenta la concentración celular del cultivo hasta alcanzar un valor máximo de 1.5 mg/l. Al variar las concentraciones de quinina en el intervalo de 0.1 mg/l a 1.0 mg/l, no se afectó considerablemente el crecimiento de las células en suspensión de *Nerium oleander*.

La curva de crecimiento del cultivo de células de *Nerium oleander* en suspensión mostró en buena parte el comportamiento típico de una curva sigmoidea. No presentó fase lag ni fase de aceleración, sin embargo presentó una fase de crecimiento exponencial de 5 días, una fase de desaceleración y una fase estacionaria a partir del décimo día.

La cinética de las células suspendidas se ajustó al modelo matemático poblacional de la función logística. En la etapa de crecimiento exponencial se observó una velocidad de crecimiento  $\mu_m = 0.608 \text{ d}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 1.14 días.

No se registró producción extracelular de peruvósido y betulina en este estudio, en ninguna de las fases del crecimiento celular. Así mismo, se determinó que el metil jasmonato (MeJA) no elicó la producción de ninguno de los metabolitos de interés.

## 6 RECOMENDACIONES

La experiencia obtenida durante el desarrollo del presente trabajo abre una gran perspectiva de investigación con el objetivo final de alcanzar una producción de metabolitos de interés farmacéutico a partir de cultivos de células en suspensión de *Nerium oleander* como los glicósidos cardiotónicos para el control de arritmias cardíacas o en tratamientos de tumores cancerígenos.

Antes de realizar las investigaciones para incrementar la producción de metabolitos secundarios, debe desarrollarse una evaluación química de los principales metabolitos de interés de la planta *in vivo* e *in vitro* en diferentes partes de la planta (raíces, tallos y hojas) con el fin de establecer las mejores líneas celulares de producción en los diferentes tipos de azucenos de la habana (*Nerium oleander*) que se encuentran en la ciudad de Medellín.

Una vez seleccionada la línea celular, se recomienda realizar los siguientes estudios:

- ✓ Optimización del medio de cultivo en la formación de callos friables a partir de diferentes hormonas y reguladores de crecimiento vegetal.
- ✓ Selección del medio más adecuado para el crecimiento y producción de metabolitos secundarios de interés de células en suspensión de *Nerium oleander*.
- ✓ Establecimiento de un medio óptimo para el crecimiento de células en suspensión de *Nerium oleander*.



- ✓ Establecimiento de un medio apropiado para la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos de células en suspensión de *Nerium oleander*.

Luego de obtener el medio óptimo, se recomienda realizar los siguientes estudios con el fin de aumentar o mejorar la producción de metabolitos secundarios de interés de *Nerium oleander*.

- ✓ Realización de estudios de optimización de la acción de variables físicas como el pH, la temperatura, el fotoperíodo y la velocidad de agitación sobre la producción de metabolitos secundarios de interés de *Nerium oleander*.
- ✓ Evaluación del efecto de diferentes precursores de los metabolitos (esteroides) sobre la producción de metabolitos secundarios de interés de *Nerium oleander*.
- ✓ Evaluación del efecto de diferentes elicitores, tanto de tipo abiótico como biótico, sobre la producción de metabolitos secundarios de interés de *Nerium oleander*.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

ABE F.; YAMAUCHI T.; MINATO K. Presence of cardenolides and ursolic acid from oleander leaves in larvae and frass of *Daphinis nerii*. *Phytochemistry*. Vol 42, (1996); p. 45-49.

ADOME RO, GACHIHI JW, ONEGI B, TAMALE J, APIO SO. The cardiotoxic effect of the crude ethanolic extract of *Nerium oleander* in the isolated guinea pig hearts. *Afr Health Sci*. 2003 Aug;3(2):77-82.

AFAQ F, SALEEM M, AZIZ MH, MUKHTAR H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion markers in CD-1 mouse skin by oleandrin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004 Mar 15;195(3):361-9.

ALFERMANN AW, PETERSEN M. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 43; pp. 199-205. (1995).

ARIAS M. Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *Thevetia peruviana* y elicitación de metabolitos secundarios tipo glicósidos cardiotónicos. Medellín. Tesis (Doctorado en Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia. (2009) 117 pp.

BEGUM S.; SULTANA R.; SIDIQI B. S. Triterpenoids from the leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry*. Vol 44, (1997); p. 329-332.

BHOJWANI, S., RAZDAN, N. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. A revised edition. Amsterdam. Elsevier Science. (1996); 921 pp.

BOURGAUD F.; GRAVOT A.; MILESI S. GONTIER E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Review. Plant Science. Vol 161, (2001); p. 839-851.

CÉSPEDES VALCARCEL A.; CORRAL SALVADÓ A.; DIAZ OLIVERA C.; MORALES FUNDORA Y. Efecto del *Nerium oleander* en modelo de corazón aislado de cobayo. Rev. Cubana Plant. Med. Vol 3, (1999); p. 74-78.

DIXON, R. A.; GONZÁLEZ R. A. Plant Cell Culture: A practical approach. Second Edition. England. IRL PRESS. (1994); 236 pp.

DODDS JH, ROBERTS LW, HESLOP-HARRISON J. Experiments in Plant Tissue Culture. 3 ed. Capítulo 2 (1995).

DUKE J. [www.ars-grin.gov/duke/](http://www.ars-grin.gov/duke/). Revisado en 2010.

ERDEMOGLU N, KÜPELI E, YESILADA E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. J Ethnopharmacol. 2003 Nov;89(1):123-9.

FRANKLIN C, DIXON R. Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: Dixon, R. and Gonzales, R.: Plant Cell Culture-A Practical Approach. 2<sup>a</sup> Edition. Chapter 1. Oxford University Press. Oxford. (1994).

FUNK, C., BRODELIUS P. Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*. Phytochemistry. (1990); 29: 845–848.

GALA R.; MITA G.; CARETTO S. Improving  $\alpha$ -tocoferol production in plant cell cultures. Journal of Plant Physiology. Vol 162, n<sup>o</sup>7 (2005); p. 782-784.

GONZALEZ VEGA M. E. Estudio del procesos de callogénesis en genotipos promisorios de caféto (*Coffea canephora* P.). (2003); p. 16-22.

HABEYCH, D. Evaluación de elicitores químicos sobre la producción de indolalcaloides en células en suspensión de *Catharanthus roseus*. Medellín. Tesis (Maestría en Biotecnología). Universidad Nacional de Colombia. (2003) 158 pp.

HAFEEZ F. Studies in the chemical constituents of Nerium oleander. Karachi. Thesis (Doctor of Philosophy). University of Karachi. (1987) 253 pp

HEFTMANN E.; LEVANT A. J. Paper chromatography of cardiac glycosides, aglycones and acetates. The Journal of Biological Chemistry. (2006); p. 703-709.

HURTADO, D., MERINO, M. Cultivo de tejidos vegetales. México. 1ª Edición. Editorial Trillas. (1988); 232 pp.

IBRAHIM A. K.; KHALIFA S.; KHAFAGI I.; YOUSSEF D.; KHAN I.; MESBAH M. Enhancement of oleandrin production in suspension cultures of *Nerium oleander* by combined optimization of medium composition and substrate feeding. Plant Biosystems. Vol 143, (2009); p. 97-103

IBRAHIM A. K.; KHALIFA S.; KHAFAGI I.; YOUSSEF D.; KHAN I.; MESBAH M. Stimulation of oleandrin production by combined *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and fungal elicitation in *Nerium oleander* cell cultures. Ezyme and Microbial Technology. Vol 41, (2007); p. 331-336

KAUSS H.; KRAUSE K.; JEBLICK W. Metil jasmonato conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenylpropanoid defense responses. Biochemical and Biophysical Reaserch. Vol 189, nº1 (1992); p. 304-308.

KETCHUM RE, RITHNER CD, QIU D, KIM YS, WILLIAMS RM, CROTEAU RB. *Taxus* metabolomics: Methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus x media* cell cultures. *Phytochemistry*. Vol. 62; pp. 901-909. (2003).

KHOSROUSHAHI A. Y.; VALIZADEH M.; GHASEMPOUR A.; KHOSROUSHAHI M.; NAHGDIBADI H.; DADPOUR M. R.; OMIDI Y. Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*. Vol 30, nº3 (2006); p. 262-269

KIERAN P. M.; MacLOUGHLIN P.F.; MALONE D. M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*. Vol 59, nº 1 y 2 (1997); p. 39-52

KREIS W, REINHARD E. The production of secondary metabolites by plant cells cultivated in bioreactors. *Planta Medica*. Vol. 55; pp. 409-416. (1989).

KYEREMATEN G, HAGOS M, WEERATUNGA F, SANDBERG F. The cardiac glycosides of *Thevetia ovata* A.DC. and *Thevetia neriifolia* Juss. *Ex Stend. Acta Pharm. Suec*. Vol. 22; pp. 37-44. (1985).

LANGFORD S. D.; BOOR P. J. Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. *Review Toxicology*. Vol 109, (1996); p 1-13.

MARTÍNEZ M. A. Esteroides cardiotónicos. Medellín. Universidad de Antioquia. (2002) 13 p.

MILLS, D. R. and LEE, J. M.. A Simple, Accurate Method for Determining Wet and Dry Weight Concentrations of Plant Cell Suspension Cultures Using Microcentrifuge Tubes. En: *Plant Cell Reports*. Vol. 15, (1996); p. 634-636.

MORENO, P. R. H; VAN DER HEIJDEN, R and VERPOORTE, R. Effect of Terpenoid Precursor Feeding and Elicitation on Formation of Indole Alkaloids in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. En: Plant Cell Reports vol 12 (1993). Pp702-705

MUELLER MJ, BRODSCHELM W, SPANNAGL E, ZENK MH. 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. Proc Natl Acad Sci U S A. 90 (16): 7490-7494.

MUÑOZ CRUZ W. M.; VANEGAS MONTERROSA O. A.; GUZMAN ROSAS A. A.; CAPATAZ TAFUR J.; HOYOS SÁNCHEZ R. A.; OROZCO SANCHEZ F. Estimación de variables de operación de un biorreactor con células de *Azadirachta indica*. Rev. Fac. Nal.Agr.Medellín. Vol 59, (2006); p. 3467-3478

MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. Vol. 15. Pp. 473-497. (1962).

NEWMAN R. A.; KONDO Y.; YOKOYAMA T.; DIXON S.; CARTWRIGHT C.; CHAN D.; JOHANSEN M.; YANG P. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. Integr Cancer Ther. 2007 Dec;6(4):354-64.

NEWMAN R. A.; YANG P.; PAWLUS A. D.; BLOCK K. J. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. Review Molecular Interventions, vol 8, (2008), p. 36-49.

NI D.; MADDEN T. L.; JOHANSEN M.; FELIX E.; HO D. H.; NEWMAN R. A. Murine pharmacokinetics and metabolism of oleandrin, a cytotoxic component of

*Nerium oleander*. Journal of Experimental Therapeutics and Oncology. Vol 2, (2002); p. 278-285.

ORTIZ LOPEZ C. M.; PRATS MOYA M. S.; NAVARRO B. A rapid chromatography method for simultaneous determination of  $\beta$ -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. Journal of Food Composition and Analysis. Vol 19, (2006); p. 141-149.

PÉREZ MIGUEL. Evaluación de los metabolitos anticancerígenos a partir de células en suspensión de *Caléndula officinalis*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. 2008

PROFUMO P.; GASTALDO P.; CAVIGLIA A. M. ; RIBOLDI U. Formation of cardiac glycosides in calli from leaf explants of *Nerium oleander* L. Plantes médicinales et phytothérapie. Vol 26, n°4, (1993); p. 340-346

ROCA, W. M. y MROGINSKI, L. A. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT (1991). 969 pp.

SALGADO G. R.; OCHOA A. Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep. Vol 8, (1990); p. 617-620.

SANCHEZ, D.; HUAMANI K.; PASCUAL E.; SANCHEZ H.; ESTRADA R. Efecto de las auxinas y citoquininas en la callogénesis sobre explantes nodales e internodales de *Tropaeolum tuberosum* (R. and P.) mashua. Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología-UNMSM. Centro Internacional de la Papa.

SCHLATMANN JE, TEN HOOPEN HJG, HEIJNEN JJ. Large-scale production of secondary metabolites by plant cell cultures. In: Plant Cell Culture Secondary

Metabolism. Toward Industrial Application. Edited by Frank DiCosmo and Masanaru Misawa. CRC Press LLC. Chapter 2. pp. 11-52. (1996).

SCREENIVASAN Y.; SARKAR A.; MANNA S. K. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor- $\kappa$ B and activator protein-1 and potentiates apoptosis induced by ceramide. *Biochemical Pharmacology*. Vol 66, (2003); p. 2223-2239.

SEO J.; JEONG J. SHIN C.; LO S.; HAN S.; YU K., HARADA E.; HAN J.; CHOI Y. Overexpression of aqualene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation. *Phytochemistry*. Vol 66, (2005); p. 869-877.

SERRANO García Manuel; PIÑOL Serra María Teresa. *Biotechnología Vegetal*. Editorial Síntesis (1991). Madrid-España.

SIDDIQUI S.; HAFEEZ F.; BEGUM S.; SIDDIQUI B. Isolation and structure of two cardiac glycosides from the leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry*. Vol 26, (1987); p. 237-241.

SKOOG F.; MILLER T. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biolm*. Vol 11, (1957); p. 118-130.

SMITH J. A.; MADDEN T.; VIJESWARAPU M.; NEWMAN R. A. Inhibition of export of fibroblast factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. *Biochem. Pharmacol*. Vol 62, (2001); p. 469-472.

SREENIVASAN Y.; SARKAR A.; MANNA S. K. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor- $\kappa$ B and activator protein-1 and potentiates apoptosis induced by ceramide. *Biochem. Pharmacol*. Vol 66, (2003); p. 2223-2239



SWARTZ H.J.; LINDSTROM J.T. Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht (Netherlands). (1986); p. 201 - 220

TOR E. R.; HOLSTEGE D. M.; GALEY F. D. Determination of oleander glycosides in biological matrices by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. Vol 44, (1996); p. 2716-2719.

TRACQUI A.; KINTZ P.; LUDES B.; MANGIN P. High-performance liquid chromatography-ionspray mass spectrometry for the specific determination of digoxine and some related cardiac glycosides in human plasma. Journal of Chromatography B. Vol 692, (1997); p. 101-109.

TURAN N, AKGÜN-DAR K, KURUCA SE, KILIÇASLAN-AYNA T, SEYHAN VG, ATASEVER B, MERIÇLI F, CARIN M. Cytotoxic effects of leaf, stem and root extracts of *Nerium oleander* on leukemia cell lines and role of the p-glycoprotein in this effect. J. Exp. Ther. Oncol. 2006;6(1):31-8.

VÁZQUEZ E.; TORRES S. Fisiología Vegetal. La Habana. Editorial Pueblo y Educación. (1995); 451 pp.

WAHBY IMANE. Aproximaciones biotecnológicas tendientes a la mejora del cáñamo (*Cannabis sativa L.*): Obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración in vitro. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2007

WANG X.; PLOMLEY J. B.; NEWMAN R. A.; CISNEROS A. LC/MS/MS/ Analysis of an oleander extract for cancer treatment. Anal. Chem. Vol. 72, (2000); p. 3547-3552.

WHITEHEAD IM, EWING DF, THRELFALL DR. Sesquiterpenoids related to the phytoalexin debneyol from elicited cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*. Vol. 27, No. 5; pp. 1365-1370. (1988).

WIKTOROWSKA E.; DLUGOSZ M.; JANISZOWSKA W. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme and Microbial Technology*. Available online 11 (2009).

YAMADA Y.; SATO F. Production of berberine in cultured cells of *Coptis japonica*. *Phytochemistry*. Vol 20, (1981); p. 545-547

YAMAMOTO H.; YATO A.; YAZAKI K.; HAYASHI H.; TAGUCHI G.; INOUE K. Increases of secondary metabolite production in various plant cell cultures by co-cultivation with cork. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. Vol 65, (2001); p. 853-860.

YAMAUCHI T. Process for isolating oleandrin from *Nerium odorum*. United States Patent 3,833,472. September 3 (1974)

YAMAUCHI T.; ABE F.; TACHIBANA Y.; ATAL C.K.; SHARMA B. M.; IMRE Z. Quantitative variations in the cardiac glycosides of oleander. *Phytochemistry*. Vol 22, (1983); p. 2211-2214.

YAMAUCHI T.; TAKAHASHI M.; ABE F. Cardiac glycosides of the root bark of *Nerium odorum*. *Phytochemistry*. Vol 15, (1976); p. 1275-1278.

ZHAO G.; YAN W.; CAO D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol 43, (2007); p. 959-962.

ZHAO J.; DAVIS L. C.; VERPOORTE R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Review. *Biotechnology Advances*. Vol 23, (2005); p. 283-333.

ZHAO M, BAI L, WANG L, TOKI A, HASEGAWA T, KIKUCHI M, ABE M, SAKAI J, HASEGAWA R, BAI Y, MITSUI T, OGURA H, KATAOKA T, OKA S, TSUSHIMA H, KIUCHI M, HIROSE K, TOMIDA A, TSURUO T, ANDO M. Bioactive cardenolides from the stems and twigs of *Nerium oleander*. *J. Nat. Prod.* 2007 Jul;70(7):1098-1103.