

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



**Casa abierta al tiempo**

**ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE CULTIVOS DE CALLO DE *Calophyllum*  
*brasiliense* (CAMBES) PRODUCTORES DE AGENTES ANTI VIH-1**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

**ANTONIO BERNABÉ ANTONIO**

Director

Dr. Francisco Cruz Sosa

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'F. Cruz Sosa', is placed to the right of the name.

Co-Director

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Abril del 2010

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo con el Convenio 471-01 Doctorado en Biotecnología”**

Iztapalapa, D.F. a 23 de abril de 2010

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad  
Iztapalapa aprobó la tesis

“ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE CULTIVOS DE CALLO DE *Calophyllum*  
*brasiliense* (CAMBES) PRODUCTORES DE AGENTES ANTI VIH-1”

que presentó:

ANTONIO BERNABÉ ANTONIO

Comité Tutorial

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Co-Director: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Asesor: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Jurado

Presidente: Dr. Juan Orozco Villafuerte

Secretario: Dra. Leticia Buendía González

Vocal: Dra. María Elena Estrada Zúñiga

Vocal: Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

The image shows three handwritten signatures in black ink. The top signature is the most legible, appearing to be 'J. Orozco'. Below it is a signature that looks like 'L. Buendía'. The bottom signature is more stylized and less legible, but appears to be 'M. E. Estrada'. The signatures are arranged vertically on the right side of the page.

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** y a la **Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa**, por el financiamiento y la aceptación respectiva, que me han permitido seguir desarrollándome.

Al **Dr. Francisco Cruz Sosa**, por su asesoría y las facilidades otorgadas durante el desarrollo de esta investigación.

Al **Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila** y al **Dr. Ricardo Reyes Chilpa**, por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A la **Dra. Leticia Buendía González**, **Dra. María Elena Estrada Zúñiga** y al **Dr. Juan Orozco Villafuerte**, por sus valiosos comentarios y el apoyo incondicional brindado, que permitieron culminar satisfactoriamente esta investigación.

Al **Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter**, que por su gran ayuda en la revisión del Artículo derivado de este trabajo.

A mis hermanos, en especial a **Victoria** que ha sido como una Madre. A mis sobrinos, **Toña, Gaby, Lalo, Nery y Pablo**, que con una sonrisa fue más que suficiente para impulsarme y seguir adelante.

A mis compañeros y amigos: **Lety, Male** y **Juan** por su valiosa amistad y por los momentos de alegría que hemos pasamos en esta Universidad.

A mis amigos: **Lorenzo Martín** y **Leonardo Álvarez**, que siempre me han brindado su amistad y me han apoyado en los momentos más difíciles.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma me ayudaron a culminar este trabajo.

*¡Gracias!*

## TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	v
1. ABREVIATURAS .....	1
2. RESUMEN .....	2
3. ABSTRACT .....	3
4. INTRODUCCIÓN.....	4
4.1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) .....	4
4.1.1. El virus de inmunodeficiencia en el mundo .....	4
4.1.2. El virus de inmunodeficiencia humana en México .....	6
4.2. Biotecnología vegetal .....	9
4.3. Cultivo de tejidos vegetales.....	11
4.4. Factores que afectan el cultivo de tejidos vegetales .....	14
4.4.1. Material vegetal.....	14
4.4.2. Medio de cultivo.....	15
4.4.2.1. Sales inorgánicas .....	15
4.4.2.2. Compuestos orgánicos.....	17
4.4.2.2.1. Reguladores de crecimiento vegetal.....	17
4.4.2.2.2. Vitaminas.....	19
4.4.2.2.3. Fuente de carbono.....	19
4.4.2.3. Material de soporte y pH .....	20
4.4.3. Temperatura, luz y humedad .....	20
4.5. Metabolitos secundarios .....	21
4.5.1. Terpenos .....	23

4.5.2. Fenoles.....	24
4.5.3. Alcaloides .....	25
4.6. Producción de metabolitos secundarios en cultivos <i>in vitro</i> .....	26
5. ANTECEDENTES .....	29
5.1. Distribución .....	29
5.1.1. Género <i>Calophyllum</i> .....	29
5.1.2. <i>Calophyllum brasiliense</i> .....	30
5.2. Usos tradicionales de <i>Calophyllum brasiliense</i> .....	32
5.3. Metabolitos secundarios del género <i>Calophyllum</i> y su actividad biológica.....	34
5.4. Cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Calophyllum</i> .....	40
6. JUSTIFICACIÓN.....	41
7. OBJETIVOS.....	42
7.1. Objetivo general .....	42
7.2. Objetivos particulares.....	42
8. HIPÓTESIS .....	43
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
9.1. Material vegetal .....	43
9.2. Establecimiento de plántulas .....	43
9.3. Evaluación de medios de cultivo, antioxidantes.....	44
9.4. Condiciones asépticas.....	45
9.5. Medio de cultivo y condiciones de incubación .....	46
9.6. Inducción de callo.....	46
9.7. Preparación de extractos y muestras para el análisis por HPLC .....	47
9.8. Análisis por HPLC .....	48
9.9. Análisis estadístico .....	49

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
10.1. Establecimiento de plántulas.....	49
10.2. Evaluación de compuestos antioxidantes y medios de cultivo.....	50
10.3. Inducción de cultivos callo.....	52
10.4. Producción de calanólidos y ácido apetalico.....	60
11. CONCLUSIONES.....	66
12. PERSPECTIVAS.....	67
13. REFERENCIAS.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de algunos medios de cultivos.....	16
Tabla 2. Rendimiento de compuestos de cultivos de células vegetales en comparación con las plantas madre. ....	27
Tabla 3. Actividad biológica y principales clases de compuestos del género <i>Calophyllum</i>	35
Tabla 4. Porcentaje de inducción de callo en explantes de hojas inmaduras de <i>C. brasiliense</i> Cambes con diferentes concentraciones y combinaciones de KIN y 2,4-D ó KIN y ANA después de seis semanas de cultivo. ....	55
Tabla 5. Porcentaje de inducción de callo en explantes de hoja inmadura y semilla madura de <i>C. brasiliense</i> , bajo diferentes concentraciones y combinaciones de BAP + IBA después de 6 semanas de cultivo. ....	58
Tabla 6. Porcentaje de inducción de callo en explantes de hoja inmadura y semilla madura de <i>C. brasiliense</i> bajo diferentes concentraciones y combinaciones de BAP + PIC y BAP + ANA después de 6 semanas de cultivo.....	59
Tabla 7. Análisis cuantitativo de calanólidos y ácido apetalico en extractos hexánicos de cultivos de callo y muestras de hoja de <i>C. brasiliense</i> . ....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número estimado de personas que viven con VIH (millones de personas) en el mundo, 1990-2008.....	5
Figura 2. Número de casos acumulados (miles de personas) de SIDA en México, por año de diagnóstico y notificación, 1990-2009. ....	7
Figura 3. Esquema general del cultivo de tejidos vegetales.....	14
Figura 4. Distribución geográfica del género <i>Calophyllum</i> .....	29
Figura 5. Distribución geográfica de <i>Calophyllum brasiliense</i> .....	30
Figura 6. Ejemplar de <i>C. brasiliense</i> en los Tuxtlas, Veracruz, México.....	31
Figura 7. Productos artesanales a base de madera, y látex como uso medicinal del género <i>Calophyllum</i> .....	33
Figura 8. Distribución geográfica en México de los quimiotipos 1, 2 y 3 de <i>C. brasiliense</i> .....	37
Figura 9. Compuestos químicos aislados de <i>Calophyllum brasiliense</i> (quimiotipo 1) .....	38
Figura 10. Compuestos químicos aislados de <i>Calophyllum brasiliense</i> (quimiotipo 2) .....	39
Figura 11. Planta joven de <i>C. brasiliense</i> que muestra hojas inmaduras usadas para el cultivo <i>in vitro</i> . ....	44
Figura 12. Explantes de <i>C. brasiliense</i> inmersos en solución antioxidante previo a la siembra .....	46
Figura 13. Establecimiento de plántulas de <i>C. brasiliense</i> en invernadero.....	50
Figura 14. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de hoja de <i>C. brasiliense</i> con diferentes compuestos antioxidantes y condiciones de incubación.....	52
Figura 15. Respuestas inducidas de callo y raíz en explantes de hoja de <i>C. brasiliense</i> , bajo tratamientos de RCV. ....	53

Figura 16. Respuestas inducidas de callo en explantes de semilla de <i>C. brasiliense</i> , con BAP 8.88 $\mu$ M + PIC 24.84 $\mu$ M. ....	57
Figura 17. Cromatograma por HPLC del calanólido B. ....	61
Figura 18. Cromatograma por HPLC del calanólido C. ....	61
Figura 19. Cromatograma por HPLC del ácido apetalico. ....	61
Figura 20. Cromatograma por HPLC de extractos de callo de semilla (CS). ....	63
Figura 21. Cromatograma por HPLC de extracto de callo de hoja (CH). ....	63
Figura 22. Cromatograma por HPLC de extracto de hojas de plantas de invernadero. ....	64

## 1. ABREVIATURAS

AIA	Ácido 3-indolacético
AIB	Ácido 3-indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA
CH	Callos provenientes de explantes de hojas
CS	Callos provenientes de explantes de semillas
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DGE	Dirección General de Epidemiología
DWAD	Detector de absorción de doble longitud de onda
DW	Dry weight
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
HPLC	High performance liquid chromatography
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
KIN	Cinetina (6-furfuril aminopurina)
MCPA	ácido 2-metil-4-cloro fenoxiacético
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	Peso/volumen (concentración)
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
PIC	Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolinico)
PVP	Polivinilpirrolidona
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SS	Secretaría de Salud
TDZ	Tidiazuron [1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il) urea]
TR	Transcriptasa reversa
Tr	Tiempo de retención
UNAIDS	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA)
v/v	Volumen/volumen (concentración)
WPM	Medio de cultivo para plantas leñosas (Woody Plan Medium)
Zeatina	6-hidroximetil buterilamino purina
VIH-1	Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1
2iP	6-dimetilamino purina
2,4,5-T	Ácido 2, 4, 5- triclorofenoxiacético
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

## 2. RESUMEN

La incidencia del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) ha aumentado drásticamente en las últimas décadas, lo que ha motivado la búsqueda de nuevos fármacos y métodos de producción. *Calophyllum brasiliense* (Cambes) es un árbol tropical que produce calanólidos, metabolitos secundarios que son activos contra la transcriptasa reversa (TR) del VIH-1. En este trabajo, se demuestra que el cultivo de tejidos vegetales es una técnica útil para la producción de estos metabolitos. Para ello, se evaluaron diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal (KIN, BAP, TDZ, ANA, 2,4-D, AIB y PIC) en explantes de hojas y semillas de *C. brasiliense* en cultivo *in vitro*, para establecer cultivos de callo capaces de producir calanólidos. Se utilizó el medio de cultivo para plantas leñosas WPM y todos los cultivos se incubaron en condiciones de oscuridad. Los resultados mostraron que, la mayor inducción de callo en explantes de semillas (100%) ocurrió con BAP 8.88  $\mu\text{M}$  + PIC 24.84  $\mu\text{M}$ , mientras que la mayor inducción de callos para los explantes de hoja (80.67%) se obtuvo con KIN 0.46  $\mu\text{M}$  + ANA 5.37  $\mu\text{M}$ . Los análisis cuantitativos realizados a los extractos hexánicos de callo por medio del HPLC, reveló que hubo mayor producción de calanólido B y calanólido C en los callos provenientes de los explantes de semillas que en aquellos desarrollados a partir de los explantes de hojas, en cantidades de 309.25 vs 8.70  $\text{mg kg}^{-1}$  PS para el calanólido B; 117.70 vs 0.0  $\text{mg kg}^{-1}$  PS para calanólido C, respectivamente. Este trabajo es un paso inicial para la investigación de la producción por cultivo de tejidos, de estos compuestos para contrarrestar el VIH-1.

### 3. ABSTRACT

The incidence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected people has drastically increased over the last few decades, and has motivated the search for new drugs and drug production methods. *Calophyllum brasiliense* (Cambes) is a rain forest tree that produces calanolides, secondary metabolites that are active against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (HIV-1 RT). In this thesis, we demonstrate that plant tissue culture is a useful technique for producing these metabolites. Different concentrations and combinations of plant growth regulators (KIN, BAP, TDZ, NAA, 2,4-D, IBA and PIC) were tested in leaf and seed explants to establish callus cultures capable of producing calanolides. Woody Plant Medium was used as substrate, and all cultures were incubated in dark conditions. The highest callus induction in seed explants (100%) occurred with BAP 8.88  $\mu\text{M}$  + PIC 24.84  $\mu\text{M}$ , whereas the highest callus inducement for the leaf explants (80.67%) occurred with KIN 0.46  $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) 5.37  $\mu\text{M}$ . HPLC quantitative analysis revealed higher calanolide B and calanolide C production in calluses from seed explants than those developed from leaves, in amounts of 309.25 vs. 8.70  $\text{mg kg}^{-1}$  DW for calanolide B; 117.70 vs. 0.0  $\text{mg kg}^{-1}$  DW for calanolide C, respectively. This study is therefore an initial step to investigating the production of these compounds in tissue culture with activity against HIV-1 RT.

## **4. INTRODUCCIÓN**

### **4.1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)**

#### **4.1.1. El virus de inmunodeficiencia en el mundo**

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), es una enfermedad inmunosupresora que resulta en infecciones oportunistas y neoplasias malignas (Singh et al. 2005). Hasta el momento dos tipos principales de VIH se han identificado, el VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es la causa de la epidemia en todo el mundo y es el más conocido, es un virus muy variable y que muta con facilidad, permitiendo así escapar de la inmunidad del huésped y crear variantes resistentes a los medicamentos y presente el mayor desafío para el desarrollo de una vacuna eficaz contra este virus (Papathanasopoulos et al. 2003). El VIH-2 es mucho menos patógeno se produce rara vez, ya que se encuentra principalmente en África occidental. (Singh et al. 2005; De Clercq 1995).

Pese a los avances constantes en la terapia antirretroviral, el SIDA causado por el VIH-1 se ha convertido en la principal causa de muerte en África y en cuarto a nivel mundial, el número de personas con el VIH está aumentando a un ritmo alarmante en la India y el sudeste asiático (OMS 2009). De acuerdo a cifras del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (UNAIDS), hasta el 2009, el porcentaje mundial de personas que viven con el VIH se ha estabilizado desde el año 2000. Sin embargo, el número de personas que viven con VIH en el mundo continuó creciendo en el 2008, estimando 33.4 millones (Figura 1), siendo 20% mayor que en el año 2000 (UNAIDS 2009).

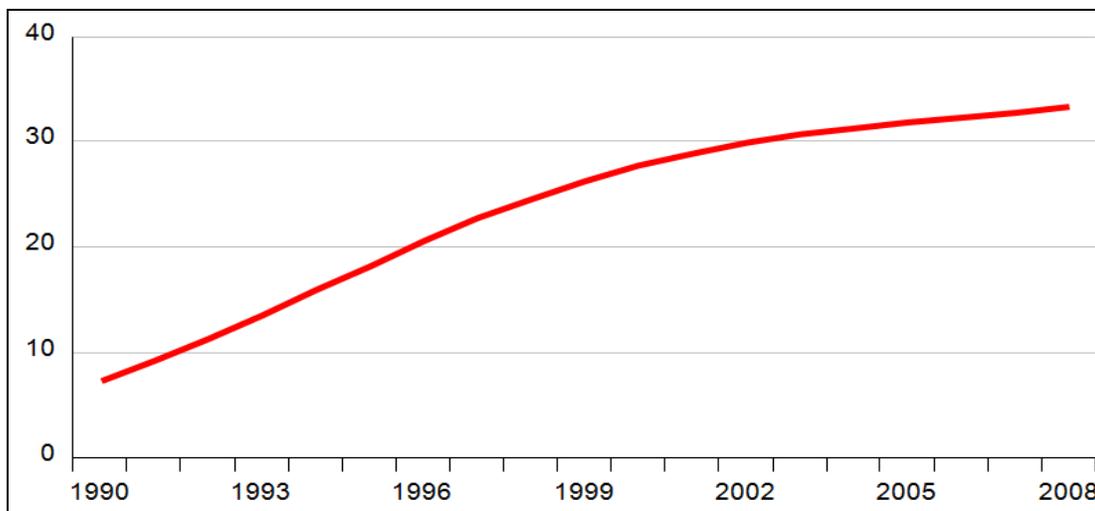


Figura 1. Número estimado de personas que viven con VIH (millones de personas) en el mundo, 1990-2008 (UNAIDS 2009).

La UNAIDS (2009) menciona también que, cada día 7,400 personas se infectan por el VIH en todo el mundo, esto es, 2.7 millones de personas contrajeron la infección en el 2009, y hubo 2 millones de defunciones relacionadas con el SIDA en este mismo año. De los 33.4 millones de personas que viven con el VIH, 31.3 millones corresponden a adultos, 15.7 millones a mujeres, y 2.1 millones a menores de 15 años. Afortunadamente, la tasa nueva de infecciones por el VIH ha disminuido en varios países pero, a nivel mundial, el aumento de nuevas infecciones en otros países contrarresta, al menos en parte, estas tendencias favorables. A medida que ha aumentado el acceso a tratamientos antirretrovirales en los últimos diez años, disminuyó el número anual de fallecimientos por SIDA (UNAIDS 2009).

#### **4.1.2. El virus de inmunodeficiencia humana en México**

En México, el SIDA ocupó el lugar 17 como causa de muerte en el 2007, pero al igual que en el resto de los países del mundo, se ha convertido en un problema prioritario de salud pública muy complejo, con múltiples repercusiones psicológicas, sociales, éticas, económicas y políticas que rebasan el ámbito de la salud, que constituye una amenaza para la seguridad nacional y para el desarrollo económico y social de las naciones. Del continente americano, México ocupa el tercer lugar después de Estados Unidos y Brasil (UNAIDS 2009). De acuerdo a estimaciones realizadas por el Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CENSIDA), de manera conjunta con el UNAIDS, en México existían 220,000 personas adultas infectadas por el VIH en el 2009. Por otra parte, CENSIDA (2009) indicó que desde el inicio de la epidemia en nuestro país en 1981, hasta el 17 de noviembre del 2009, en el Registro Nacional de Casos de SIDA se han contabilizado 135,003 casos acumulados de SIDA. Además, Magis et al. (2008) con apoyo de los datos de CENSIDA menciona que la mayoría de los casos registrados correspondían a personas que ya habían fallecido y el resto (39%) a quienes padecían la enfermedad y se encontraban recibiendo tratamiento antirretroviral. De estos casos, el 80% correspondía a hombres y 20% a mujeres, lo que indicó que por cada cinco hombres se ha infectado una mujer. El intervalo de edades que comprende 15 a 44 años acumula el 77.5% de los casos, seguido por un 20.1% en personas mayores de 45 años y el resto (2.4%) corresponde a personas de 0 a 14 años. En el año de 1999 se elevó la notificación oportuna de los diagnósticos debido a la oferta de tratamientos antirretrovirales a cargo del IMSS y la Secretaría de Salud (SS) (Figura 2).

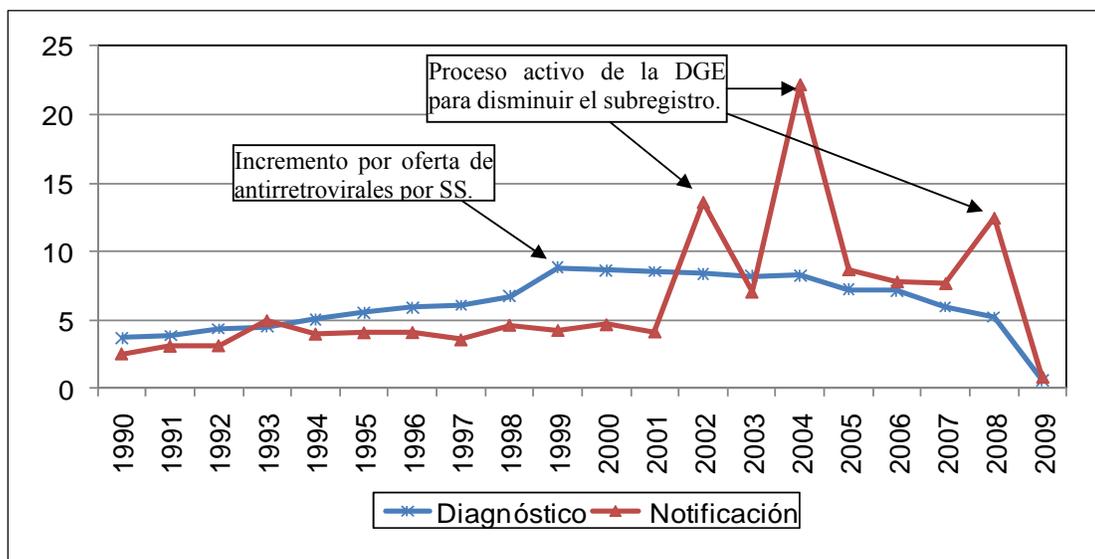


Figura 2. Número de casos acumulados (miles de personas) de SIDA en México, por año de diagnóstico y notificación, 1990-2009 (CENSIDA 2009).

A diferencia del año 2004 cuando solamente se había registrado puntualmente el 18.6% de los casos ingresados al Registro Nacional de Casos de SIDA, entre los años 2005 y 2007 se consiguió registrar eficazmente entre el 50% y el 65%, lo que indicó la presencia de una mejoría progresiva en el registro adecuado de los nuevos casos diagnosticados en cada año (Magis et al. 2008). Las cifras más elevadas en los años 2002, 2004 y 2008 fueron debidos a procesos activos de la Dirección General de Epidemiología (DGE) para disminuir el subregistro de casos.

En lo que se refiere a la distribución del VIH, hasta marzo del 2009 se registró que el 54.5% de los casos se concentró en sólo seis entidades federativas: Distrito Federal (16.9%), Estado de México (11.0%), Veracruz (9.1%), Jalisco (8.0%), Puebla (4.8%) y Baja California (4.7%) (CENSIDA 2009). Conocer las cifras de mortalidad por VIH/SIDA y realizar el adecuado seguimiento y análisis de las mismas posee un valor estratégico

enorme a la hora de evaluar logros y fracasos en la lucha contra la infección en México. En otras palabras, la mortalidad disminuiría siempre y cuando descienda el nivel de contagio, se detecte el VIH/SIDA en sus etapas más tempranas y se apliquen tratamientos específicos mas sencillos, económicos y eficaces (Magis et al. 2008).

En relación a esto, han hecho esfuerzos con el objetivo de buscar medicamentos más efectivos y de bajo costo, sin embargo hasta el momento, no se tiene alguna droga que pueda eliminar el VIH. La bioactividad guiada por el fraccionamiento de los extractos crudos ha proporcionado moléculas dirigidas al descubrimiento de drogas candidatas anti-VIH. Es así, que durante la última década, se han realizado importantes progresos en la investigación sobre productos naturales que poseen actividad anti-VIH (Singh et al. 2005). Algunos ejemplos, son los extractos del género *Ipomoea carnea*, varias especies de *Vitex* sp., *Canna indica*, *Justicia gendarussa*, extractos de *Rhus chinensis*, e incluso algunas cianobacterias verde-azules de agua dulce se han mostrado tener de moderada a buena actividad contra el VIH (Jassim y Naji 2003; Wang et al. 2006; Woradulayapinij et al. 2005). A la fecha se ha logrado identificar poco más de 120 compuestos naturales, principalmente de plantas, que pueden contrarrestar *in vitro* los efectos citopáticos de células infectadas con este tipo de virus e impedir su replicación. Estos compuestos presentan una gran diversidad estructural encontrándose, entre otros, alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanos, fenoles, quinonas, saponinas, diterpenos, triterpenos, xantonas y polisacáridos sulfatados (Reyes-Chilpa y Huerta-Reyes 2009).

## **4.2. Biotecnología vegetal**

Originalmente el concepto de biotecnología se circunscribía al campo de la ingeniería bioquímica, de manera fundamental en el área de la microbiología industrial y la tecnología enzimática (Garibay et al. 1993). Sin embargo ha adquirido un significado más amplio. La biotecnología es un gradiente de tecnologías que van desde las técnicas de la biotecnología tradicional como la fermentación de alimentos y el control biológico, hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas de la ingeniería genética (Altman 1999). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO 2000), menciona que de acuerdo al convenio sobre la diversidad biológica, se define a la biotecnología como: "toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos". En el sentido amplio de la definición de biotecnología, la biotecnología vegetal constituye el empleo de las plantas para la producción de bienes y servicios, incluyendo todas las técnicas agronómicas y hortícolas tradicionales, pues sin éstas, no podría alcanzarse el objetivo de la biotecnología que es la producción de cultivos de mayor calidad y mas alto rendimiento (Robert et al. 1993). En las tres últimas décadas, la biotecnología moderna ha emergido como un área promisoría que ofrece diversas oportunidades para la manipulación de los sistemas biológicos y su explotación comercial (Díaz 2005). En la actualidad, diversos problemas relacionados con la elaboración de productos se resuelven mediante la aplicación de biotecnologías novedosas. Las aplicaciones mas potenciales de la biotecnología vegetal sobre la producción de alimentos son enormes y prácticamente todos los cultivos alimentarios pueden beneficiarse en una forma u otra de las nuevas técnicas como en mayores rendimientos, incrementar la superficie cultivable y mayor calidad de productos (Robert et

al. 1993). En este aspecto, la biotecnología vegetal contribuye en cuatro enfoques principales: a) la multiplicación masiva de cultivares sanos y de alta calidad a través de las técnicas de propagación *in vitro* conocidas como micropropagación, b) la generación de germoplasma libre de enfermedades, c) la generación de plantas con nuevas características genéticas, y d) la conservación de germoplasma por medio de cultivos *in vitro* contribuirá también aunque indirectamente, al mejoramiento genético de los cultivos (Robert et al. 1993; Altman 1999; George et al. 2008).

Por otra parte, la biodiversidad de México ofrece varias opciones, que sólo con las herramientas de la biotecnología vegetal es factible aprovechar; por ejemplo, el desarrollo del campo de la etnobotánica para la identificación de especies con principios activos para la producción de nuevos fármacos, aditivos y enzimas para la industria puede constituirse en una nueva actividad sumamente redituable para las comunidades vinculadas a las zonas de reserva ecológica, propiciando con ello, su aprovechamiento racional y su protección (Bosh 2003). Aproximadamente el 25% de todos los fármacos prescritos en los países industrializados contienen compuestos que son directa o indirectamente, a través de semi-síntesis, derivados de las plantas, y muchas veces el sustitutos sintéticos no poseen la misma eficacia y especificidad farmacológica (Neumann et al. 2009). De acuerdo a Rates (2001), el 11% de los 252 medicamentos que son considerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como básicos y esenciales, derivan exclusivamente de las plantas con flores.

En las últimas dos décadas la biotecnología vegetal se ha desarrollado como un área nueva y prometedora en el campo de la biotecnología, centrándose en la producción de metabolitos secundarios vegetales. Para algunos compuestos de interés, como la escopolamina la morfina, la quinina, vinblastina, atropina, y la digoxina, hasta el momento

no se han podido llegar a un proceso comercialmente viable, lo que ha limitado la cantidad de investigación en el desarrollo de alternativas biotecnológicas para la producción de cada uno de los productos mencionados (Verpoorte et al. 1994). Aunque en la biotecnología vegetal los esfuerzos de investigación de las plantas se han diluido, para algunos compuestos se ha podido incrementar considerablemente los niveles de producción, por ejemplo, shikonina (Tabata 1988) y berberina (Fuyita y Tabata 1987). Actualmente la investigación se centra especialmente en las posibilidades de aplicar la ingeniería metabólica para mejorar el rendimiento a niveles comercialmente interesantes. Si bien es cierto que la biotecnología moderna abarca una gran variedad de instrumentos de investigación, muchos de los productos exitosamente comercializados en la actualidad provienen de dos grandes áreas, la ingeniería genética y el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Diaz 2005).

### **4.3. Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) o cultivo *in vitro* vegetal es una poderosa herramienta de la biotecnología moderna, y a grandes rasgos, esta tecnología consiste en el uso de partes aisladas de las plantas, llamados explantes, y mantenidos en un medio nutritivo artificial aséptico bajo condiciones ambientales controladas (Barba et al. 2001). Este medio nutritivo funciona como reemplazo de las células, tejidos o elementos conductores originalmente vecinos del explante (Neumann et al. 2009).

Pierik (1990), menciona seis tipos de cultivos *in vitro* o cultivo de tejidos vegetales:

1. Cultivo de plantas intactas: se siembra la semilla *in vitro*, de la cual se obtiene una plántula y finalmente una planta.
2. Cultivo de embriones: se cultiva el embrión aislado después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.
3. Se cultiva *in vitro* un órgano aislado (una porción de tejido o un órgano). Se pueden distinguir distintos tipos, por ejemplo, cultivos de meristemos, cultivos de ápices del vástago, cultivo de raíces, cultivo de anteras, etc.
4. Cultivo de callo: Es un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular presentando una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido.
5. Cultivo de células aisladas. Es el crecimiento de células individuales obtenidas de un tejido, callo o cultivo en suspensión.
6. Cultivo de protoplastos: Se obtiene a partir de células, por digestión enzimática de la pared celular.

Se debe enfatizar en que el CTV es una serie de técnicas que se utilizan en investigación y en la producción comercial de productos vegetales y plantas. En el primer caso, se ha empleado en estudios de fisiología, bioquímica, morfogénesis, anatomía, embriología, fitomejoramiento y preservación de germoplasma; mientras que el segundo caso se utiliza en la biosíntesis de productos naturales (saborizantes, colorantes, aromatizantes, fármacos)

y en la micropropagación de plantas ornamentales, forestales, frutales y hortícolas (Barba et al. 2001).

El cultivo de tejidos vegetales explora también condiciones que promueven la división celular y la reprogramación genética en condiciones *in vitro*. Además, se ha convertido en un procedimiento estándar para la biotecnología vegetal y hoy en día se puede reconocer cinco grandes áreas donde el cultivo *in vitro* de células es generalmente aplicado (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota 2006): a) propagación a gran escala de material elite, b) generación de individuos fértiles genéticamente modificados; c) como un modelo para estudios de fisiología celular vegetal; d) preservación de especies en peligro de extinción y recursos fitogenéticos; y e) para la producción de productos naturales o metabolitos secundarios.

Dentro de estas aplicaciones, la propagación *in vitro* o micropropagación es una de las técnicas más estudiadas, con mayores avances y la que más se aplica comercialmente a un mayor número de especies, incluyendo a muchas plantas medicinales (Barba et al. 2001; Rout et al. 2000). Este último autor menciona también que la propagación de plantas, a través del cultivo de tejidos se puede dividir en tres grandes categorías: el enfoque más común consiste en aislar los meristemas organizados como ápices o yemas axilares e inducirlos para convertirse en plantas completas, este sistema de propagación es comúnmente conocida como la micropropagación; en el segundo enfoque, los brotes adventicios se inician en las hojas, raíz y del tallo o en segmentos de callos derivados de dichos órganos; el tercer sistema de propagación consiste en la inducción de embriogénesis somática en células y en cultivos de callos (Figura 3). Otra de las grandes aplicaciones en que actualmente se está potencializando en la técnica del CTV, es la producción de

compuestos de gran valor para la industria, la cual es un área de intensa investigación dentro de la biotecnología.

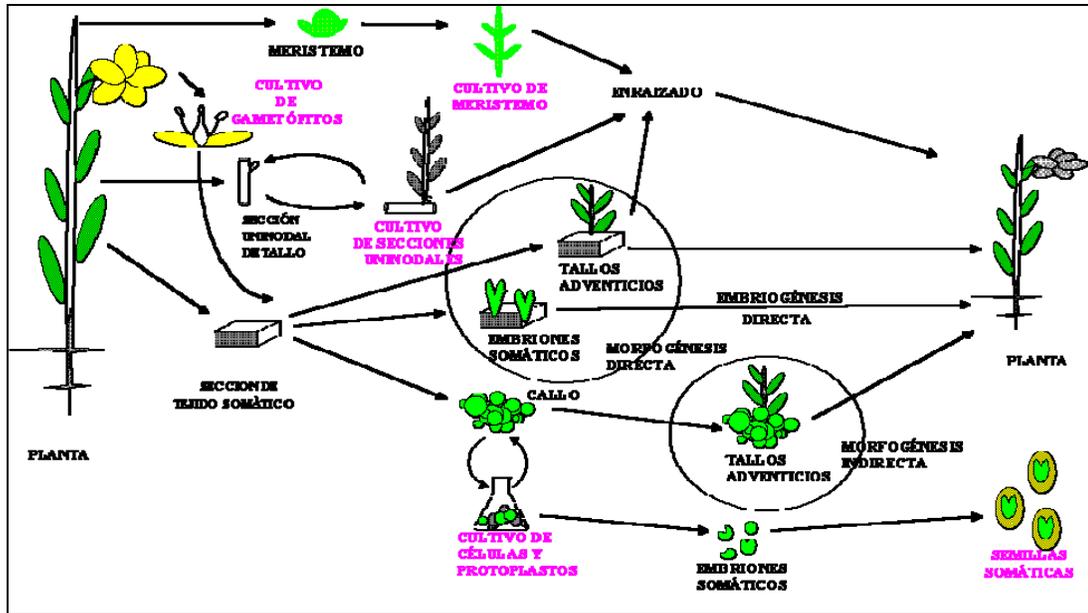


Figura 3. Esquema general del cultivo de tejidos vegetales (Lindsey y Jones 1989).

#### 4.4. Factores que afectan el cultivo de tejidos vegetales

En gran parte, el éxito del cultivo de tejidos vegetales se encuentra en sí, en el propio material vegetal, la composición del medio de crecimiento (sales inorgánicas), hormonas, y condiciones del cultivo tales como la temperatura, pH, luz, y humedad (Pierik 1990; Cardoza 2008).

##### 4.4.1. Material vegetal

El material vegetal por sí mismo, así como el medio de cultivo y los factores fisiológicos de crecimiento, pueden influir en el crecimiento y desarrollo *in vitro*. La capacidad de regeneración de las plantas es muy variada, siendo las dicotiledóneas las que generalmente

se regeneran mejor que las monocotiledóneas. Además, conforme una planta envejece, su capacidad regenerativa suele disminuir, por lo cual, se tienen que utilizar plantas juveniles. Los tejidos jóvenes, no lignificados, generalmente son los más apropiados para el cultivo, aunque esto puede variar. Por otra parte, es importante que el material vegetal este sano, puesto que esto repercute en el porcentaje de infección. También se ha observado que los explantes obtenidos de plantas de campo son más difíciles de regenerar que aquellas provenientes de invernadero. Es conocido que es mucho más difícil inducir el crecimiento en estructuras muy pequeñas como células, agregados de células, y meristemos, que en estructuras más grandes, como explantes de hojas, tallo o tubérculos (Pierik 1990).

#### **4.4.2. Medio de cultivo**

##### **4.4.2.1. Sales inorgánicas**

El medio de crecimiento es una composición de minerales esenciales y vitaminas que son necesarias para el crecimiento y desarrollo de la planta, es decir, sin agua y nutrientes minerales, las plantas o los explantes no pueden vivir *in vitro*, ya que no son completamente autótrofos cuando se desarrollan en estas condiciones. Los minerales constan de macronutrientes como el nitrógeno (N), potasio (K), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg), y azufre (S), que son requeridos por las plantas en grandes cantidades (g/l); mientras a aquellos que se requieren en cantidades mínimas (mg/l) se denominan micronutrientes como el hierro (Fe), zinc (Zn), cloro (Cl), boro (B), cobre (Cu), níquel (Ni), molibdeno (Mo), manganeso (Mn) (Pierik 1990; Cardoza 2008). Estos elementos junto con el carbono (C), oxígeno (O) y el hidrógeno (H), conforman los 17 elementos esenciales. Algunos otros, como el cobalto (Co), aluminio (Al), sodio (Na) y el yodo (I) han sido esenciales o benéficos para algunas especies (George et al. 2008).

Por lo general, los medios de cultivo (Tabla 1), están basados en formulaciones ya establecidas (Pierik 1990; Gamborg y Phillips 1995).

Tabla 1. Composición de algunos medios de cultivos.

Componentes	Gamborg et al (1976)	Murashige y Skoog (1962)	Lloyd y McCown (1981)
	mg l <sup>-1</sup>		
<b>Macronutrientes</b>			
KNO <sub>3</sub>	2500	1900	—
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	—	—	556.00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	—	1650	400.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·SO <sub>4</sub>	134.00	—	—
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	150.00	—	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	170.00	170.00
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	—	990.00
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150.00	440.00	96.00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250.00	370.00	370.00
<b>Micronutrientes</b>			
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.80	27.80	27.80
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	13.20	22.30	22.30
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.00	8.60	8.60
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.00	6.20	6.20
KI	0.75	0.83	—
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	—
Na <sub>2</sub> EDTA	37.30	37.30	37.30
<b>Compuestos orgánicos</b>			
Mioinositol	100.0	100.0	100.0
Glicina	—	2.0	—
Ácido nicotínico	1.0	0.5	0.5
Piridoxina	1.0	0.5	0.5
Tiamina	10.0	0.1	1.0
Sacarosa (g/l)	20.0	30.0	20.0

Fuente: Pierik (1990) y Gamborg y Phillips (1995).

Uno de los medios nutritivos más usados en el CTV es el de Murashige y Skoog (1962), que fue desarrollado para el crecimiento óptimo de cultivos de callos de tabaco, y el desarrollo resultó útil para un gran número de especies. Este medio, consiste en preparar por separado soluciones base (stock) de macroelementos, microelementos, etc., almacenarlas en frío y mezclarlos en la proporción adecuada en el momento de su utilización (Pina 2008), aunque actualmente se encuentran formulaciones preparadas a nivel comercial. A pesar de que este medio de cultivo es más utilizado para la mayoría de las plantas, no siempre es el más adecuado para ciertas especies, debido a su alto contenido de sales. Por ejemplo algunas especies responden mejor al medio realizado por Lloyd y McCown (1981). Este medio de cultivo denominado Woody Plant Medium (WPM) es usado ampliamente para el cultivo de tejidos de plantas leñosas o sensibles a la salinidad (Cardoza 2008, Pierik 1990).

#### **4.4.2.2. Compuestos orgánicos**

##### **4.4.2.2.1. Reguladores de crecimiento vegetal**

Los RCV más usadas en el cultivo de tejidos son las auxinas, tales como, el ácido 3-indolacético (AIA), ácido 3-indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2, 4, 5- triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 2-metil-4-cloro fenoxiacético (MCPA). Las auxinas como el AIA (auxina natural) se utilizan en concentraciones de 0.01 a 10 mg l<sup>-1</sup>, y las auxinas sintéticas como AIB, ANA y 2,4-D, se usan desde concentraciones menores que van desde 0.001-10 mg l<sup>-1</sup>, por ser relativamente más activas. Las auxinas estimulan principalmente la elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias, inhibición

de formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos de células en suspensión. Es decir, con una concentración baja de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones da lugar a la formación de callo (Pierik 1990). Se menciona también que, el 2,4-D y 2,4,5-T son muy efectivas para el crecimiento de callos (Bhojwani y Razdan 1983). Por otra parte, el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico ó picloram (PIC), es un herbicida de tipo sistémico que a concentraciones bajas tiene efectos similares a las auxinas (Collins et al. 1978). Aunque no es comúnmente usado, se han obtenido resultados favorables para la inducción de callo, brotes y embriogénesis somática (Valverde y Arias 1989; Beyl y Sharma 1983).

Las citocininas por su parte, se usan para estimular el crecimiento y el desarrollo, siendo las más comunes, el 6-furfurilaminopurina ó cinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP), 6-dimetilaminopurina (2iP), y 6-hidroximetilbuterilaminopurina (zeatina). Estos reguladores, además de promover la división celular, inducen la formación de vástagos axilares por la disminución de la dominancia apical y retarda el envejecimiento y se usa generalmente altas concentraciones de 1-10 mg l<sup>-1</sup> (Cardoza 2008; Pina 2008; Pierik 1990). Además de estos reguladores también se ha llegado a utilizar el N-fenil-N'-1,2,3-tidiazol-5-il urea ó tidiazuron (TDZ), el cual induce una gran diversidad de respuestas en el cultivo. El TDZ presenta la propiedad única de imitar los efectos de las auxinas y a las citocininas en el crecimiento y la diferenciación de los explantes cultivados (Murthy et al. 1998). En concentraciones menores de 0.22 mg l<sup>-1</sup> puede inducir mayor proliferación axilar que muchas otras citocininas, sin embargo, al incorporar cantidades mayores a 0.22 mg l<sup>-1</sup>, el TDZ puede estimular la formación de callos, brotes adventicios ó embriones somáticos (Huettema y Preece 1993).

#### **4.4.2.2.2. Vitaminas**

Las vitaminas más utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales son la tiamina (B1), piridoxina (B6) y el ácido nicotínico (PP ó niacina). La única vitamina que ha demostrado tener importancia en el cultivo de células y órganos es la tiamina, y se usan concentraciones de 0.1-5 mg l<sup>-1</sup> al igual que el ácido nicotínico (PP ó niacina), mientras que la piridoxina es de 0.1-1 mg l<sup>-1</sup>. Estas dos últimas se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos (Hurtado y Merino 1987). El mio-inositol tiene un efecto estimulante muy significativo y se utilizan concentraciones generalmente de 100-200 mg l<sup>-1</sup>. El ácido cítrico junto con el ácido ascórbico (vitamina C), a veces se utilizan en concentraciones muy elevadas (1-100 mg l<sup>-1</sup>), principalmente para evitar la oxidación de ciertos inóculos (Pierik 1990).

#### **4.4.2.2.3. Fuente de carbono**

En adición, las plantas requieren de una fuente de carbono externa (azúcares), ya que los cultivos *in vitro* no fotosintetizan lo suficiente para soportar las necesidades de carbono del tejido, además de que el crecimiento de ciertos cultivos tiene lugar en condiciones de oscuridad (Cardoza 2008). La fuente de carbono más usada es la sacarosa y se emplean concentraciones de 2 a 3%, pudiendo variar de acuerdo a la especie entre 5 a 12%. Generalmente el crecimiento y desarrollo aumentan con la concentración de azúcar, hasta que alcanza un óptimo, mientras que disminuye a elevadas concentraciones (Pierik 1990).

#### **4.4.2.3. Material de soporte y pH**

Como material de soporte, el agar ( $8 \text{ g l}^{-1}$ ) es el más usado en el cultivo de tejidos, pues provee al medio un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inoculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibidoras o estimulantes del crecimiento, por lo que, se pueden sustituir por Gelrite o Phytigel ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ), los cuales son más puros y de apariencia clara que el agar (Cardoza 2008; Hurtado y Merino 1987).

El pH en el medio es de gran importancia ya que influye en la absorción de varios componentes del medio, la mayoría de éstos se ajustan a un pH de 5.2-5.8 (Cardoza 2008). Pierik (1990) menciona que el pH en el rango de 5-6.5 es apto para el crecimiento, con un máximo de 6.0, mientras que un pH bajo (menor de 4.5) o alto mayor de 7), generalmente frena el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Si el pH es demasiado bajo, puede ocasionar que la auxina AIA y el ácido giberélico sean menos estables, el agar pierde su rigidez, y algunas sales como el fierro y fosfato pueden precipitar.

#### **4.4.3. Temperatura, luz y humedad**

Otros tipos de factores que influyen en el cultivo son la luz, temperatura y la humedad relativa. A pesar de que los cultivos de tejidos no son fotosintéticamente eficientes, la iluminación influye en los procesos morfogenéticos y en general en el metabolismo. El fotoperiodo generalmente utilizado es de 16 horas luz y 8 de oscuridad, intensidad de luz de  $25\text{-}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Algunos cultivos son también incubados en la oscuridad, debido a que la luz incrementa la producción de compuestos fenólicos, los cuales interfieren con el crecimiento del cultivo de callos (Pina 2008; Cardoza 2008; George y Davis 2008). A

veces, dependiendo de la especie experimental, se elige una temperatura más baja (18° para especies bulbosas), o una temperatura más alta (28-29° para especies tropicales), pero debe tomarse en cuenta que la temperatura interior de los recipientes que contienen los cultivos *in vitro* es 3-4 grados más alta que en la cámara de crecimiento. Por otra parte, debe tenerse también en cuenta que la humedad en los recipientes del cultivo es relativamente alta, por lo que la humedad de la cámara de crecimiento debe ser 30-50%. Sin embargo, si la humedad es elevada en la cámara, dará como resultado una mayor cantidad de infecciones al igual que una elevada temperatura (Pierik 1990).

#### **4.5. Metabolitos secundarios**

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como los azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de ellos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros), esenciales para la vida celular y, en general, de la planta (Piñol et al. 2000). Estos procesos constituyen, en su conjunto, el metabolismo primario, y a los compuestos indicados se denominan metabolitos primarios, los cuales están involucrados directamente en el crecimiento y en el metabolismo (Ramawat 2007). Además de estos procesos metabólicos, en las plantas se pueden desarrollar otras rutas que conducen a la formación de compuestos usualmente peculiares de ciertos grupos taxonómicos vegetales (género, especie o familia) (Ramawat 2007). Estas rutas constituyen el metabolismo secundario y sus productos secundarios se denominan metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales (Piñol et al. 2000). Estos compuestos están considerados como productos finales del metabolismo primario y por lo general no están involucrados en

procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, translocación, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación, formación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Taiz y Zeiger 2006).

La distribución de los metabolitos secundarios en las plantas es mucho más restringida que el de los metabolitos primarios; un compuesto a menudo sólo se encuentra en unas pocas especies, o incluso dentro de unas pocas variedades de una especie (Smetanska 2008). Además, la biosíntesis de estos metabolitos se restringe también a fases específicas del desarrollo, tanto del organismo como de las células especializadas, y a períodos de estrés causados, por ejemplo, por la deficiencia de nutrientes, factores ambientales, o el ataque de microorganismos (Piñol et al. 2001). También, desempeñan un papel importante en la adaptación de las plantas con su entorno, y en su mayoría tienen un papel ecológico puesto que protegen a las plantas de ser comidas por herbívoros y en contra de ser infectados por patógenos; sirven como atrayentes (olor, color y sabor) de polinizadores, y al ser ingeridas por animales ayudan a la dispersión de las semillas; funcionan también como agentes de competencia entre las plantas y a la simbiosis de microorganismo planta (Bourgaud et al. 2001; Taiz y Zeiger 2006). Por ejemplo, se ha probado que las plantas producen fitoalexinas como respuesta al ataque de bacterias y hongos (Gurib-Fakim 2006). La producción de metabolitos secundarios suele ser bajo (menos del 1% PS), dependiendo en gran medida de estos tipos de factores (Neumann et al. 2009). Por otra parte, muchas plantas han sido utilizadas desde cientos de años para el tratamiento y cura de las enfermedades infecciosas y no infecciosas, lo que propició una de las bases más importantes para el nacimiento de la medicina (Samuelsson 2004 y Floriani et al. 2006). En la actualidad, la investigación y desarrollo se centran en las plantas que producen metabolitos secundarios de interés farmacéutico, tales como, sustancias con

inmunomoduladores, antibióticos, antiparasitarios, antitumoral, antiinflamatorio, hipoglucemia y antivirales (Yamada 1991).

De acuerdo a Croteau et al. (2000), los metabolitos secundarios vegetales se clasifican generalmente en tres grandes familias (terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides).

#### **4.5.1. Terpenos**

Los terpenos o terpenoides constituyen la clase más grande de los productos secundarios, y el nombre deriva del hecho que fue el primer miembro de la clase que fue aislado de la trementina (“terpentin”) (Croteau et al. 2000). Las diversas sustancias de esta clase son generalmente insolubles en agua. Todos los terpenos se derivan de unidades de cinco átomos de carbono (Taiz y Zeiger 2006). En el metabolismo primario los terpenos funcionan como constituyentes de membranas, pigmentos fotosintéticos, sustancias de crecimiento y hormonas vegetales. La mayoría de los terpenos se encuentran en resinas, látex, ceras y aceites, y le confieren toxicidad o indigestas como una medida de defensa contra herbívoros (Staba 1982). Por ejemplo, los piretroides que ocurren en las hojas y flores de especies de *Chrysanthemum* funcionan como insecticida; los cardenólidos de la planta *Digitalis purpurea* tienen un sabor amargo y son extremadamente tóxicos para animales superiores incluyendo a humanos; los aceites esenciales de la menta, el limón, la albahaca y la salvia, contienen monoterpenos volátiles que dan un olor característico al follaje; las hormonas vegetales como las giberelinas y los brasinoesteroides las cuales regulan el crecimiento; los esteroides que forman parte de la membrana celular; y los carotenoides rojos, naranja y amarillos funcionan como accesorios en la fotosíntesis y protegen a los tejidos fotosintéticos de la oxidación (Taiz y Zeiger 2006). Algunas

familias de plantas en las que los terpenos se encuentran en abundancia son la Asteraceae, Chenopodiaceae, Taxaceae y Euphorbiaceae (Habermehl y Fliegner 1998).

#### **4.5.2. Fenoles**

Los fenoles son otras de las características comunes de las plantas, las cuales contienen una gran variedad como flavonoides, estilbenos, taninos, cumarinas, lignanos y ligninas, y varios funcionan como antibióticos y pesticidas naturales. Otros actúan como señales químicas en la floración y la polinización de las plantas, y en los procesos de simbiosis vegetal como en la fijación del nitrógeno y de parasitismo vegetal (Heldt y Heldt 2005). Los polifenoles son de características aromáticas y de fácil oxidación en las plantas, tienden a ser solubles en agua y usualmente se localizan en la vacuola. Económicamente son importantes porque contribuyen al sabor, aroma y color de los alimentos y bebidas, por ejemplo, el aroma y el sabor del té están relacionados con el contenido de polifenoles de la hoja, así mismo, el sabor amargo de la cerveza se debe a su contenido de humulona, mientras que el color rojo del vino es debido a la presencia de antocianinas (Piñol et al. 2000). Las cumarinas pueden encontrarse en cubiertas de semillas, frutos, flores, raíces, hojas y tallos, aunque en general las mayores concentraciones se encuentran en frutos y flores, ya que juegan un papel importante en defensa antimicrobial, antialimentaria, filtro de UV, y tiene propiedades inhibitoras de la germinación (Croteau et al. 2000). Estos compuestos se producen en varias plantas de las familias por ejemplo, Rutaceae, Umbellifereae, Solanaceae y Clusiaceae (Ramawat 2007).

### **4.5.3. Alcaloides**

Los alcaloides pertenecen a un grupo de metabolitos secundarios que se sintetizan de aminoácidos y contienen 1 o más átomos de nitrógeno como constituyentes de heterociclos. Son de naturaleza alcalina (básica) y generalmente solubles en agua (Held y Held 2005;).

Por otra parte, los alcaloides, a diferencia de la mayoría de los otros productos naturales constituyen el grupo de sustancias vegetales secundarias más representativo, numeroso y diverso (Taíz y Zeiger 2006). Estos compuestos han sido utilizados desde hace mucho tiempo por los humanos en forma de extractos de plantas como veneno, estimulantes, y narcóticos. La importancia de los alcaloides para la planta que los produce radica en que constituyen reservorio de nitrógeno para sí misma, a la vez, pueden actuar como sustancias alelopáticas o disuasorios alimentarios, contribuyendo así a la defensa vegetal o el ataque de determinados patógenos o depredadores (Piñol, et al. 2000). Por ejemplo, la nicotina del tabaco se usó como uno de los primeros insecticidas por el humano, y sigue siendo uno de los más efectivos; la cafeína es una toxina efectiva para insectos, se encuentran en hojas y semillas del cacao, café, hierba de mate, y té (Croteau et al. 2000). Casi todos los alcaloides son tóxicos para los humanos cuando se usan en cantidades suficientes, sin embargo, a concentraciones bajas son útiles farmacológicamente tales como la morfina, la codeína y la escopolamina, y otros, como la cocaína, la nicotina y la cafeína se usan como estimulantes o sedantes (Taiz y Zeiger 2006).

#### **4.6. Producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro***

Las plantas medicinales se han utilizado como una fuente importante de fármacos durante miles de años, y aún son base de las prácticas sistemáticas de la medicina tradicional en muchos países de todo el mundo (Pan et al. 2009). Además, el descubrimiento de fármacos de plantas medicinales sigue proporcionando nuevas e importante pistas contra varios objetivos farmacológicos incluyendo el cáncer, el Alzheimer, la malaria, y el dolor, como señalan Balunas y Kinghorn (2005). Dichos autores también mencionan que, a pesar de que el descubrimiento de principios activos de plantas medicinales sigue proporcionando una importante fuente de nuevos fármacos, hay numerosos desafíos como la adquisición de materiales vegetales. Por otra parte, la producción de metabolitos secundarios de plantas se ha logrado por mucho tiempo a través del cultivo solo de algunas plantas medicinales en campo. Sin embargo, las plantas procedentes de biotopos específicos pueden ser difíciles de cultivar fuera de sus ecosistemas. También ocurre que las plantas comunes no resisten los grandes cultivos de campo, debido a la sensibilidad de patógenos, lo que ha llevado a los científicos y biotecnólogos a considerar el cultivo de tejidos y células vegetales como una forma alternativa de producir los metabolitos secundarios correspondientes (Bourgaud et al. 2001).

El primer gran avance de la técnica del cultivo de tejidos ocurrió con el establecimiento exitoso de líneas celulares capaces de producir altos rendimientos de metabolitos secundarios en cultivos de células en suspensión (Zenk 1978). Los productos de más alto interés son generalmente glucósidos y alcaloides. Junto a estos, esteroides, enzimas, pigmentos, los cuales también, son de considerable interés. Tales son los casos de la producción de vinblastina y la vincristina en líneas celulares de *Catharanthus roseus*, quinolina en *Cinchona ledgeriana* y diosgenina en cultivos de callos de *Dioscorea*

*deltoidea*, entre otros (Constable et al. 1981; Scragg et al. 1990; Ravishankar y Grewal 1991). A nivel comercial se han logrado en cultivos *in vitro* la producción industrial de algunos compuestos como la shiconina, ginsenósidos y berberina, en biorreactores con escalas de 4000 a 75000 litros (Merillon 2007). Ambos productos se usan comúnmente en la industria de alimentos, el primero como colorante y el segundo como saborizante (Calva-Calva et al. 2000). Existen en la literatura, reportes de una serie de cultivos de células vegetales que producen una mayor cantidad de metabolitos secundarios que en las plantas madre (Tabla 2) (Smetanska 2008).

Tabla 2. Rendimiento de compuestos de cultivos de células vegetales en comparación con las plantas madre.

Compuesto	Especie	Rendimiento (% PS)		
		Cultivo <i>in vitro</i>	Planta madre	Cultivo/planta
Ajmalicina	<i>Catharanthus roseus</i>	1	0.3	3.3
Antraquinonas	<i>Morinda citrifolia</i>	18	2.2	8
Berberina	<i>Coptis japonica</i>	13	2	3.3
Ginsenósidos	<i>Panax ginseng</i>	27	4.5	6
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	3.4	2	1.7
Acido rosmarínico	<i>Coleus blumei</i>	27	3	9
Shiconina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	20	1.5	13.5
Ubiquinona-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	0.036	0.003	12

Fuente: Smetanska (2008).

Por otra parte, también se ha incrementado el interés en las medicinas naturales que se obtienen de las plantas o extractos de ellas. Los sistemas tradicionales de utilizar medicamentos a base de plantas medicinales están en aumento, lo que ha dado lugar a una enorme presión sobre la biodiversidad y la destrucción de los biotopos de valor particular en los países en desarrollo (Neumann et al. 2009).

Las plantas son la fuente tradicional de muchos productos químicos y farmacéuticos. La mayoría de los productos naturales valiosos son resultado del metabolismo secundario de las plantas, y poseen gran complejidad estructural de forma que la síntesis artificial es difícil y costosa, por lo cual, el cultivo de células vegetales es una técnica prometedora para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios complejos (Barz y Ellis 1981; Ravishankar y Venkataraman 1988). Algunos ejemplos de medicamentos derivados directa o indirectamente de los vegetales son el paclitaxol (Taxol), la podofilotoxina y la camptotecina, para tratar el cáncer. La morfina, es utilizada como analgésico, y otros productos semi-sintéticos (hormonas esteroidales) son derivados de la diosgenina (Neumann et al. 2009).

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. Distribución

#### 5.1.1. Género *Calophyllum*

La familia Clusiaceae o Guttiferae consta de aproximadamente 50 géneros y 1200 especies distribuidas en todo el mundo (Cronquist 1981). De acuerdo a Stevens (1980), el género *Calophyllum* está constituido por 187 especies, todas ellas árboles tropicales, de las cuales 179 especies se encuentran en la Zona Indo-Malasia y solo 8 especies en el continente Americano, distribuyéndose principalmente en México, Centroamérica y Sudamérica (Figura 4). Entre las especies del género *Calophyllum* más conocidas por su importancia química y medicinal se encuentran: *C. brasiliense*, *C. fragrans*, *C. inophyllum*, *C. dispar*, *C. thwaitesii*, *C. moonii*, *C. cordato-oblongum*, *C. paniciflorum*, *C. caledonicum*, *C. mucigerum*, *C. teysmannii*, *C. venulosum*, *C. polyanthum*, *C. blancoi* y *C. enervosum*. *C. brasiliense* es la más investigada en éste género por sus actividades biológicas (Cechinel-Filho et al. 2009).

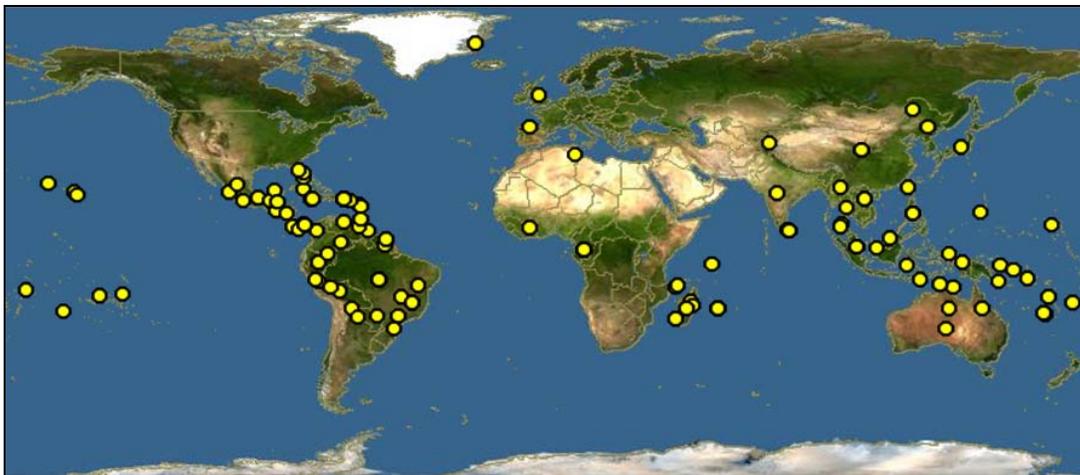


Figura 4. Distribución geográfica del género *Calophyllum* (<http://www.discoverlife.org>).

### 5.1.2. *Calophyllum brasiliense*

*Calophyllum brasiliense* Cambes es un árbol tropical que pertenece a la familia Clusiaceae. Comúnmente se conoce como Ocú, barí, sakbalamté, barillo, cedro cimarrón y guaya, entre otros, dependiendo de la región donde se encuentre. *C. brasiliense* es la especie con mayor distribución en América, y de su género, es el de mayor importancia medicinal. Se encuentra en las selvas tropicales húmedas desde Brasil hasta México (Figura 5). Esta especie, es la única de su tipo en México, y se localiza desde el sur de Veracruz hasta Quintana Roo y de Nayarit hasta Chiapas, a una altitud de 0 a 650 msnm (Niembro 1986).

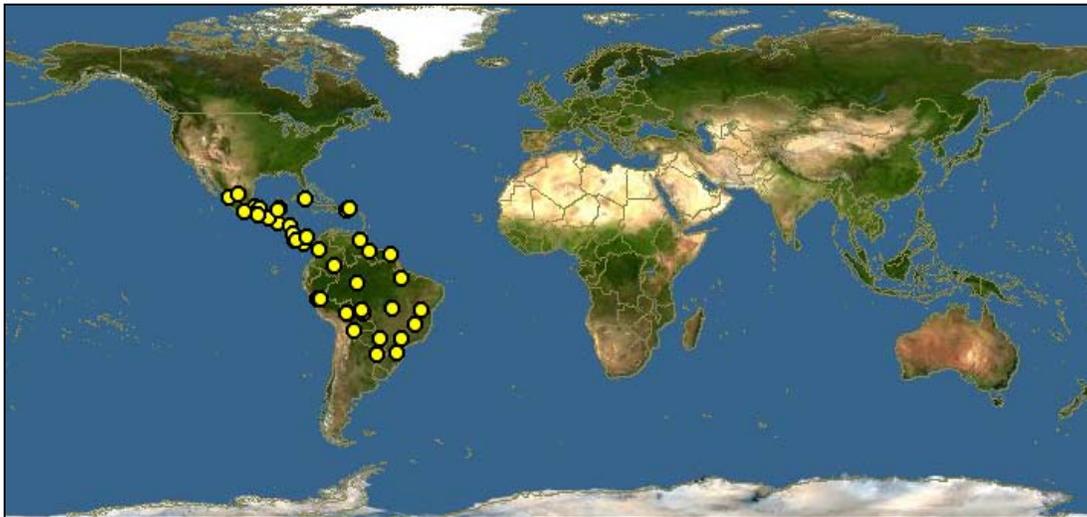


Figura 5. Distribución geográfica de *Calophyllum brasiliense* (<http://www.discoverlife.org>).

De acuerdo a Pennington y Sarukhán (1968) y Niembro (1990), esta especie se describe como un árbol caducifolio de 20 a 45 m de altura y un diámetro de 40 a 60 cm (Figura 6). La corteza externa es fisurada de color pardo morena, interna de color crema rosado, laminada, fibrosa, amarga y con exudado amarillo. Las hojas son decusadas, simples; láminas de 6 x 2.5 a 14 x 5.5 cm, elípticas u oblongas, verde oscuras y brillantes en el haz,

verde pálidas en el envés; glabras; nervadura central prominente en el envés; nervios secundarios perpendiculares al central, numerosos y cerca uno del otro; de textura coriácea. Algunos árboles tiran las hojas en abril o mayo en las zonas más secas. Las flores son dioicas, en panículas axilares de 2 a 5 cm de largo, glabras; flores masculinas y bisexuales perfumadas, sépalos verdosos, glabros, pétalos de color crema amarillentos, estambres numerosos y flores femeninas con el perianto semejantes a las masculinas, ovario súpero hinchado, estilo corto, estigma grande y obtuso, florece de julio a diciembre.

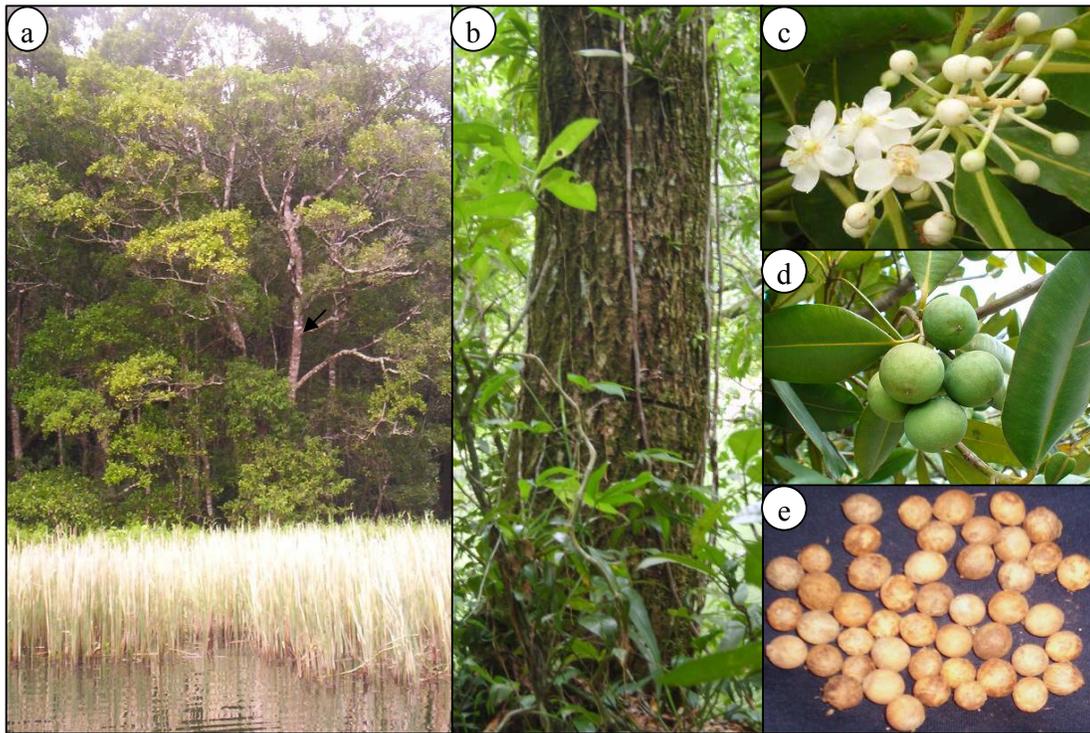


Figura 6. Ejemplar de *C. brasiliense* en los Tuxtlas, Veracruz, México. a) planta adulta, b) tronco fisurado, c) inflorescencia en forma de panícula, d) frutos inmaduros y e) semillas maduras.

Los frutos son drupas de 2.5 a 3 cm de largo, ovoides o esféricas, verde amarillentas en la madurez, de olor fragante, con endocarpio duro y una semilla grande por fruto. El mesocarpio contiene fibras que se contraen y arrugan cuando se secan. Las semillas son esféricas de 1.5 x 1.3 cm, blanco amarillentas, sin endospermo. Maduran generalmente de octubre a diciembre.

De acuerdo a Cronquist (1981), la clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Theales

Familia: Clusiaceae

Género: *Calophyllum*

Especie: *brasiliense*

## **5.2. Usos tradicionales de *Calophyllum brasiliense***

El género *Calophyllum* comprende plantas a las cual se les ha atribuido gran cantidad de usos en los trópicos (Figura 7).

Dentro de los usos tradicionales más comunes del género *C. brasiliense* destacan los siguientes:

**Maderable:** Se elaboran artículos torneados y artesanías. Se ha usado para sustituir al cedro y la caoba. Su principal producto es la madera de excelente calidad que se usa para hacer quillas, mástiles, costillas y armaduras de embarcaciones así como para muebles finos, triplay, parquet, puentes, carrocerías, armazones, tejamanil, chapas, ebanistería,

durmientes, decoración de interiores, partes de molinos, puertas y ventanas, telares, pasamanos, huellas y descansos, mangos para cubiertos. La madera es especialmente útil para los platos de comida y calabazas, ya que no imparte algún sabor a los alimentos (Stevens 1980; Dweck y Meadowsy 2002).



Figura 7. Productos artesanales a base de madera, y látex como uso medicinal del género *Calophyllum* (Friday y Okano 2006).

**Aromatizante:** La corteza contiene un aceite esencial semejante al del sándalo.

**Combustible:** El aceite que contienen las semillas se utiliza con fines de iluminación.

**Forrajero:** En algunos países se usa como alimento para ganado, además son fuente de alimento para una gran cantidad de animales del bosque.

**Colorante:** La corteza, hervida por 25 minutos produce un tinte de color pardo, excelente en la tinción de fibras naturales.

**Medicinal:** En algunas comunidades rurales en México se ha extraído el aceite de las semillas, y se ha usado para curar enfermedades cutáneas. La resina que mana del tronco se

conoce como bálsamo de María y se le atribuyen propiedades medicinales para disminuir la comezón en la piel, cicatrizar úlceras, diuréticas, inflamación de ojos e insolación (Niembro 1986; Dweck y Meadowsy 2002). En particular, las hojas y corteza de *C. brasiliense* frecuentemente se usan en la medicina tradicional para tratar diferentes enfermedades como dolor, infecciones, infusiones para el asma, y como laxantes (Oliveira 1994). También se han usado para tratar la bronquitis, disturbios gástricos y hepáticos (Sartori et al. 1999), diabetes e hipertensión (Duke y Martínez 1994), diarrea y herpes (Rutter 1990), así como, reumatismo, varices, hemorroides y úlceras crónicas (Correa 1978).

### **5.3. Metabolitos secundarios del género *Calophyllum* y su actividad biológica**

El género *Calophyllum* es considerado con un rico potencial para obtener nuevos compuestos especialmente con actividades químicas y biológicas y que puede contribuir al desarrollo de la fitoterapia. Las plantas del género *Calophyllum* contienen principalmente cumarinas, xantonas, flavonoides, esteroides, y triterpenos, algunos de ellos con actividad biológica relevante (Tabla 3) (Cechinel-Filho et al. 2009).

Varios compuestos del género *Calophyllum* han sido estudiados desde el punto de vista farmacológico, para contrarrestar algunas enfermedades como el cáncer, el cual es una de las patologías comunes en todo el mundo. Al respecto, se ha demostrado que este género contiene compuestos como el calofilolido y mammea B/BB, potentes contra líneas celulares de leucemia humana (HL-60) (Ito et al. 2006) y células cancerígena KB de la nasofaringe (Guilet et al. 2001). Por otra parte, la cumarina GUT-70 inhibió el crecimiento de otras células de leucemia (BV173) (Kimura et al. 2005). Las mammeas A/BA y A/BB,

cumarinas tipo mammea han destacado por tener propiedades altamente citotóxicas contra líneas tumorales PC3 (próstata), K562 (linfoma) y U251 (sistema nervioso central) (Reyes-Chilpa et al. 2004).

Tabla 3. Actividad biológica y principales clases de compuestos del género *Calophyllum*

<b>Especie</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Tipo de compuesto</b>
<i>C. brasiliense</i>	Analgésico, antiviral Antiulceregénico, anticancerígeno	Terpenos, coumarinas, xantonas Cromanonas, flavonoides
<i>C. fragrans</i>	Antibacterial, molusquicida	Triterpenos
<i>C. inophyllum</i>	Desconocida	Xantonas
<i>C. dispar</i>	Antitumoral, antiviral	Coumarinas, Xantonas
<i>C. thwaitesii</i>	Citotóxica, antibacterial	triterpenos
<i>C. moonii</i>	Desconocida	Coumarinas
<i>C. cordato-oblongum</i>	Desconocida	Xantonas, terpenos
<i>C. panciflorum</i>	Desconocida	Xantonas, biflavonoides
<i>C. caledonicum</i>	Desconocida	Xantonas, biflavonoides
<i>C. mucigerum</i>	Antifúngico, antimalaria	Xantonas
<i>C. teysmannii</i>	Antileucémico, insecticida	Xantonas, coumarinas
<i>C. venulosum</i>	Desconocida	Xantonas
<i>C. polyanthum</i>	Desconocida	Biflavonoides
<i>C. blancoi</i>	Desconocida	Coumarinas, ácido benzoico
<i>C. enervosum</i>	Desconocida	Cromanonas, xantonas
<i>C. enervosum</i>	Antibacterial	Xantonas, cetonas

Fuente: Cechinel-Filho et al. 2009.

Varias familias de plantas producen diversos metabolitos secundarios que poseen actividad para detener la infección por el VIH (Harnett et al. 2005; Mi-Jeong et al. 2002; Ovenden et al. 2004). En particular, la familia Clusiaceae, de la cual destaca el género *Calophyllum*, es una de las fuentes actuales para este tipo de investigación, ya que produce cumarinas cuyos

metabolitos tienen actividad significativa contra el VIH-1 (Dharmaratne et al. 2002; McKee et al. 1996, Reyes-Chilpa y Huerta-Reyes 2009).

En una colecta de hojas de *C. lanigerum* var. *Austrocoriaceum* realizada en Malasia en 1987, se aisló por primera vez las cumarinas calanólido A y calanólido B, en el cual se demostró que ambos compuestos fueron altamente activos para inhibir la TR del VIH-1 (Kashman et al. 1992). Posteriormente, en un esfuerzo por identificar una fuente natural suficiente y sostenible del calanólido A, se llevaron a cabo estudios químicos y biológicos del exudado de látex de esta misma especie, en el cual no se encontró el calanólido A. Mientras que en los extractos de látex de *C. teysmannii* var. *inophylloide*, se observó de forma abundante el calanólido B (costatólido) y que actualmente está siendo evaluado como una alternativa posible al calanólido A para el desarrollo de fármacos anti-VIH (Fuller et al. 1994; Buckheit et al. 1999). Patil et al. (1993) menciona que otras cumarinas como el inofilum B y el inofilum P, aisladas de *C. inophyllum* Linn, fueron activos contra la TR del VIH-1 en cultivos de células infectadas, aunque otros compuestos relacionados como el inófilum A, C, D, y E, incluyendo el ácido calofílico fueron menos activos o totalmente inactivos.

Para el caso particular de México, sólo existe la especie, *C. brasiliense* Cambes. En estudios realizados en el Instituto de Química de la UNAM, se evaluaron extractos de diferentes colectas de hojas de *C. brasiliense*, los cuales revelaron la existencia de dos quimiotipos, es decir, tienen dos diferentes composiciones químicas en sus hojas (Huerta-Reyes et al. 2004 y Reyes et al. 2004). Éstos se distribuyen en las zonas húmedas del país (Figura 8) (Fonseca 2007).

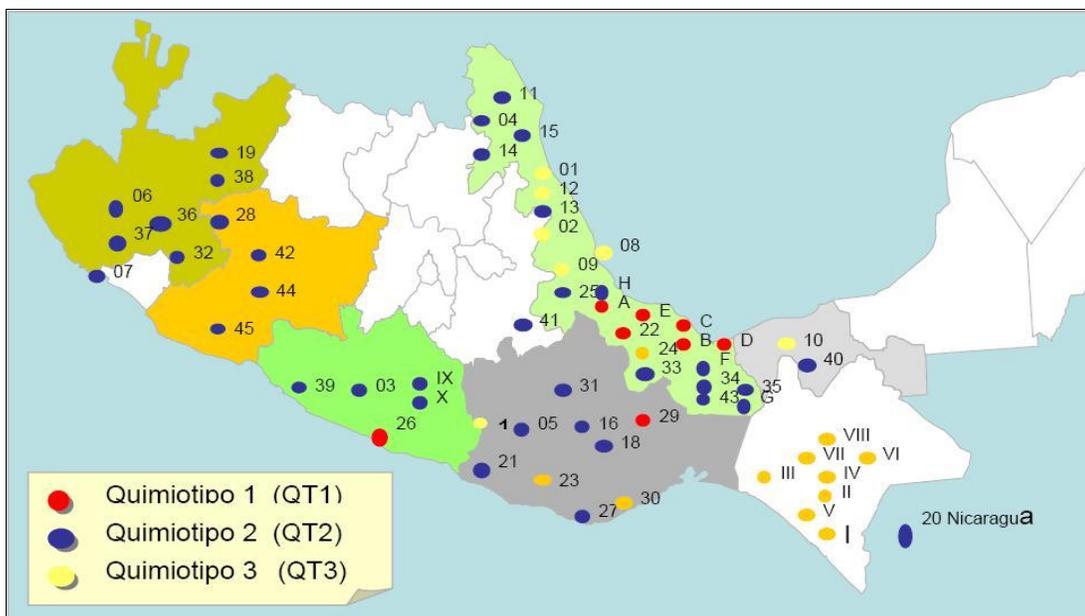


Figura 8. Distribución geográfica en México de los quimiotipos 1, 2 y 3 de *C. brasiliense* (Fonseca 2007).

El primer quimiotipo (quimiotipo 1) produce cumarinas tipo mammeas (Figura 9) y tienen alta actividad citotóxica en células tumorales humanas *in vitro* (Reyes-Chilpa et al. 2004). El segundo quimiotipo (quimiotipo 2) contiene compuestos minoritarios dipirano cumarinas tetracíclicas (Figura 10), como el (+)-calanólido A, el (-)-calanólido B y el (+)-calanólido C, los compuestos mayoritarios son cromanonas, principalmente el ácido apetalico de los cuales, los dos primeros son inhibidores potentes *in vitro* de TR del VIH-1 (Huerta-Reyes et al. 2004). Sin embargo, el contenido de calanólidos es bajo, mientras que los compuestos más abundantes son cromanonas, de las cuales el ácido apetalico es el compuesto mayoritario y tiene también actividad contra hongos fitopatógenos y antibacteriana (Aguilar-Bañuelos 2005; Cottiglia et al. 2004). Otro estudio realizado por Fonseca (2007) reveló la presencia de un tercer quimiotipo (Figura 8) con un perfil cromatográfico diferente a los quimiotipos 1 y 2, y que actualmente están en estudio.

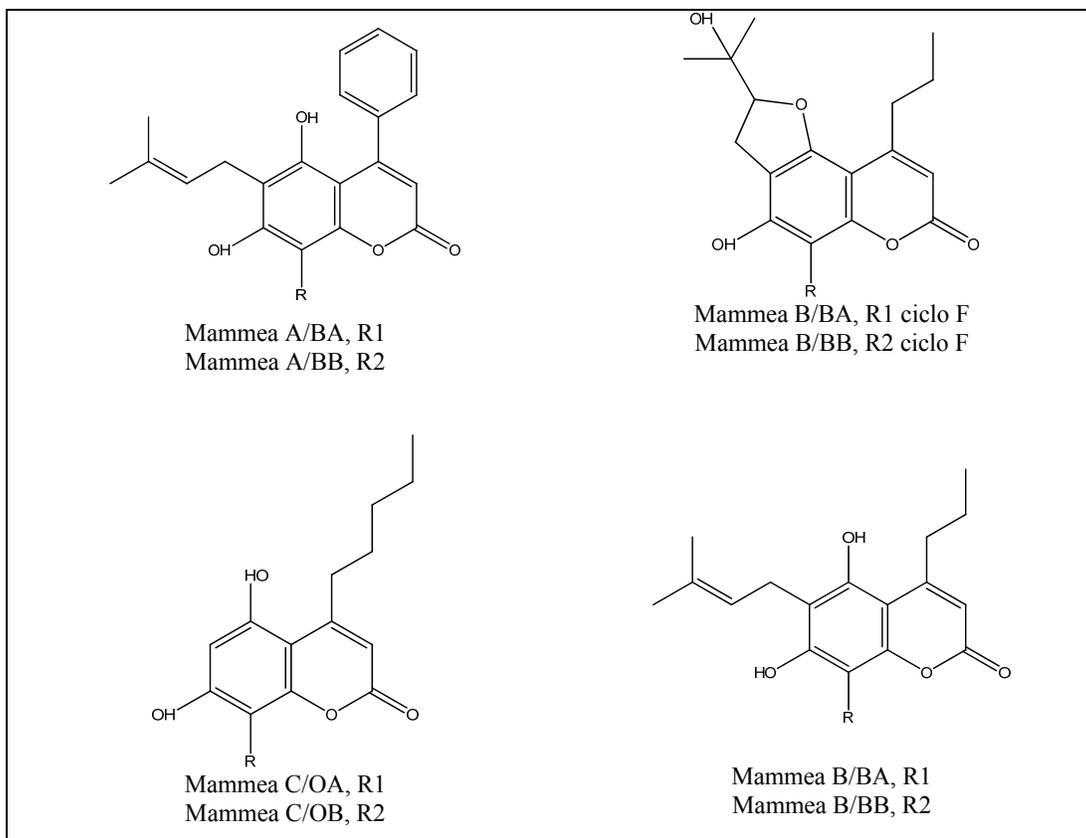


Figura 9. Compuestos químicos aislados de hojas de *Calophyllum brasiliense* (quimiotipo 1). (Reyes-Chilpa et al. 2004).

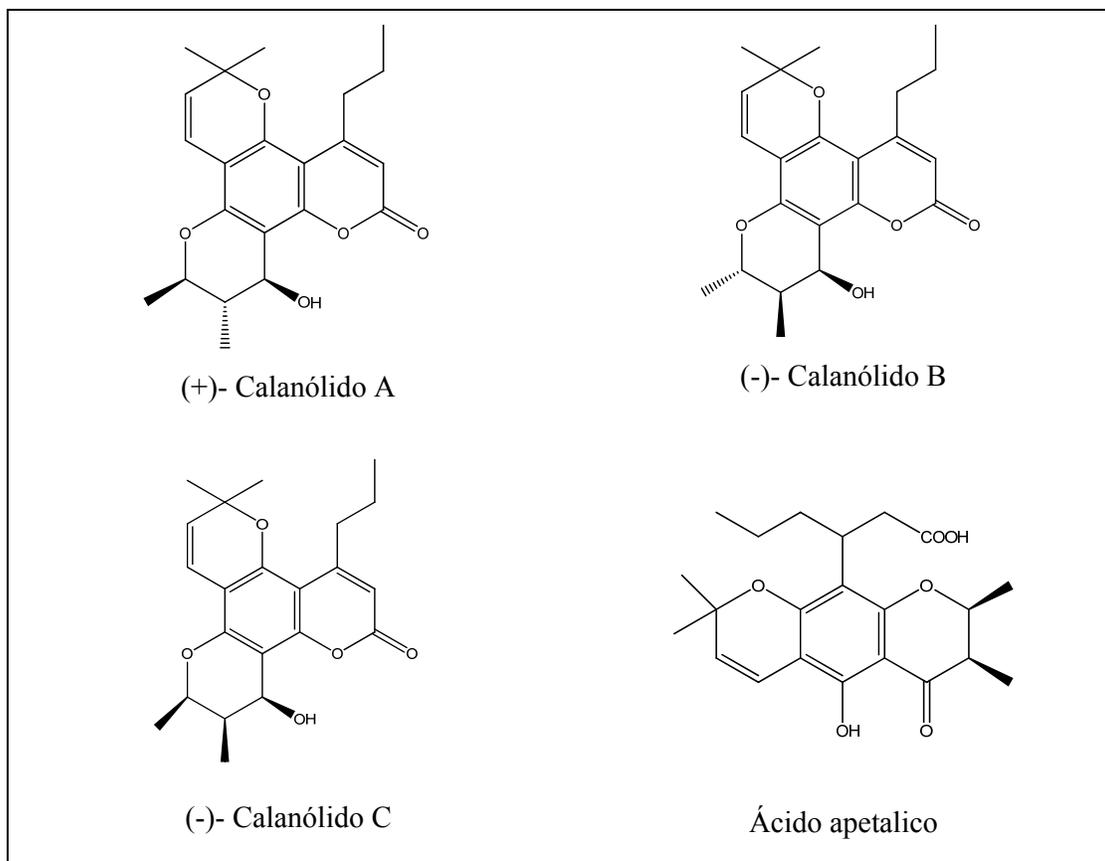


Figura 10. Compuestos químicos aislados de hojas de *Calophyllum brasiliense* (quimiotipo 2) (Huerta-Reyes et al. 2004).

Las xantonas de la madera de *C. brasiliense* inhiben en un rango de 21-83% el crecimiento del micelio de *Postia placenta*, un hongo xilófago común (Reyes et al. 1997). Además, el ácido apetalico, un compuesto aislado de las hojas, presentó actividad contra hongos fitopatógenos *Curvularia lunata* y *Rhizoctonia repens* Aguilar-Bañuelos (2005). En otro estudio, se demostró que compuestos aislados de extractos metanólicos de raíces, tallos, hojas, flores y frutos, en su mayoría tuvieron efectos positivos en contra de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Pretto et al. 2004). Los extractos orgánicos de diversas especies mexicanas fueron evaluadas para determinar su actividad antimicrobiana, específicamente contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se encontró que las

mejores son cinco plantas, dentro de las que destaca *C. brasiliense* (Yasunaka et al. 2005). Por otra parte, en una evaluación *in vitro* de *Leishmania amazonensis*, un protozoario que causa leishmaniosis, se encontró que el compuesto aislado mamma A/BB, una cumarina de *C. brasiliense* tuvo actividad en contra de este organismo en 50-90% (Brenzan et al. 2008, 2007). Por lo tanto, estos estudios demuestran el por qué del uso tradicional de extractos de la planta en contra de afecciones antimicrobianas. Otro estudio reciente, relacionado a problemas gástricos, se demostró que los extractos de esta especie, evaluados en ratas de manera *in vitro* e *in vivo*, presentaron actividad contra la bacteria *Helicobacter pylori*, validando así el uso popular de esta planta para tratamientos antiulcerosos (Souza et al. 2009).

#### **5.4. Cultivo *in vitro* del género *Calophyllum***

Aunque el género *Calophyllum* parece ser una fuente prometedora de fármacos anti-VIH, pocos trabajos se han realizado sobre estas especies en lo que a cultivos *in vitro* se refiere, e inicialmente fueron enfocados a estudios de micropropagación debido a que la especie se encuentra en zonas restringidas, aunado a esto, la explotación de bosques (Nair y Seni 2003), por lo que sus poblaciones y sus hábitat están desapareciendo. En un estudio sobre micropropagación estos mismos autores reportaron alta eficiencia y multiplicación *in vitro* de *C. apetalum* quienes obtuvieron un 85% supervivencia *ex situ* de las plantas micropropagadas. En otro trabajo relacionado en *C. inophyllum* también se han obtenido resultados favorables de micropropagación, del cual se han obtenido porcentajes de supervivencia hasta del 72% en condiciones de campo (Thengane et al. 2006). Por otra parte, debido a la importancia de ésta planta por sus propiedades medicinales contra el

VIH, se han realizado trabajos recientemente sobre la producción de metabolitos secundarios en cultivo *in vitro* del género *Calophyllum*. Los estudios realizados en *C. inophyllum* fueron enfocados a la producción de dipiranocumarinas anti-VIH en cultivos de callo y cultivos de células suspensión y los resultados fueron prometedores al obtener altas cantidades de inofilum B, inofilum D, calofilólido, inofilum A, inofilum P, y el inofilum C, con 40.5, 44.7, 45.2, 73.7, 141.3 y 142.1 mg/100 g de peso fresco de callo, respectivamente (Pawar et al. 2007; Pawar y Thengane 2009). Sin embargo, hasta el momento no se han realizado trabajos sobre cultivos *in vitro* de la especie *C. brasiliense*.

## **6. JUSTIFICACIÓN**

Tanto en México como el mundo, el VIH sigue aumentando año tras año, y la producción de los fármacos para combatir el SIDA son cada vez más costosos, lo que ha motivado a la exploración de nuevos fármacos y métodos para su producción. Algunos estudios actuales se están enfocando a la investigación de productos naturales de algunas plantas que producen diversos compuestos para detener la infección por el VIH. La familia Clusiaceae, en especial el género *Calophyllum* ha tenido mayor relevancia por contener compuestos con buena actividad anti VIH-1 como son los calanólidos. Sin embargo, estudios realizados han demostrado que este tipo compuestos se encuentran en concentraciones muy bajas, por lo cual, se requieren grandes cantidades de materia seca para obtener mínimas cantidades (menos del 1%). Por otra parte, ésta especie posee amenaza potencial por la disminución de la población debido a diferentes factores bióticos y factores abióticos. Los sistemas tradicionales de utilizar medicamentos a base de plantas medicinas, están aumentando en todo el mundo. Esto ha dado lugar a una enorme presión sobre la biodiversidad, y la

destrucción de los biotopos de valor particular en los países en desarrollo que participan en el cumplimiento de las exigencias de los mercados mundiales. La tecnología del Cultivo de Tejido Vegetales podría ser una herramienta útil para superar estas limitaciones y proporcionar nuevos medios para la producción de metabolitos secundarios. Recientemente se ha realizado un estudio sobre la producción *in vitro* de distintos tipos de inofilum en *C. inophyllum* contra el VIH; sin embargo no existen estudios relacionados para la producción de calanólidos, utilizando cultivo de tejidos de *C. brasiliense*.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1. Objetivo general**

Establecer las condiciones para el establecimiento de cultivos de callo de *C. brasiliense* Cambes capaces de producir compuestos inhibidores del HIV-1.

### **7.2. Objetivos particulares**

Evaluar diferentes tipos de explantes (hojas juveniles y semillas maduras) para la inducción de callo.

Evaluar distintos reguladores de crecimiento vegetal (auxinas: ANA, AIB, 2,4-D y picloram; y citocininas: KIN, BAP y TDZ) en la inducción de callo en cultivos de *C. brasiliense*.

Seleccionar líneas celulares de callos de *C. brasiliense* a partir de cultivos de ambos tipos de explantes.

Identificar y cuantificar los metabolitos secundarios (calanólidos) inhibidores del VIH-1.

## **8. HIPÓTESIS**

*C. brasiliense* es una planta que de forma natural produce calanólidos, metabolitos secundarios que poseen una fuerte actividad contra la reversa transcriptasa del VIH-1, por lo que se espera que los cultivos *in vitro* de callo de ésta especie retengan la capacidad de sintetizar dichos metabolitos.

## **9. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **9.1. Material vegetal**

Se colectaron frutos y semillas de *C. brasiliense* Cambes, en el mes de noviembre del 2005, 2006 y 2007 en la región de Los Tuxtlas, en la comunidad de La Laguna del municipio de Catemaco, Estado de Veracruz, México. Un muestra de la planta previamente identificada y registrada con el número 14425 se depositó en el herbario del IMSS (Huerta-Reyes et al. 2004).

### **9.2. Establecimiento de plántulas**

Las semillas sin endocarpio y sin tegumento fueron desinfectadas con una solución fungicida de Bravo 720 (tetracloroisofalónitrilo) al 27% (v/v) durante una hora y fueron germinadas bajo condiciones de sombra en contenedores de plástico con agrolita y peat moss como sustrato a una relación 1:1, respectivamente. Cuando las plántulas alcanzaron entre 10 y 15 cm de altura (aproximadamente 3 meses después), se transfirieron a bolsas negras de polietileno de 20 x 30 cm conteniendo una mezcla de agrolita, peat moss y tierra

negra (1:1:1). Las plantas se condicionaron y crecieron en el invernadero localizado en la Universidad Autónoma Metropolitana Campus Iztapalapa (UAM-I).

Una vez que las plantas se climatizaron y empezaron a crecer nuevos brotes, las hojas inmaduras de aproximadamente 5 cm de longitud se cortaron de la planta para ser usadas como recurso de explantes para el cultivo *in vitro* (Figura 11).



Figura 11. Planta joven de *C. brasiliense* que muestra hojas inmaduras usadas para el cultivo *in vitro*.

### 9.3. Evaluación de medios de cultivo, antioxidantes

Se evaluaron diferentes medios de cultivo como el MS (Murashige y Skoog 1962), B5 (Gamborg et al. 1976), y WPM de Lloyd y McCown (1981), sin RCV (Tabla 1). Además, se evaluaron diferentes tipos de compuestos considerados como antioxidantes: a) ácido cítrico 100 mg l<sup>-1</sup> + ácido ascórbico 50 ó 150 mg l<sup>-1</sup>, b) carbón activado 250 ó 500 mg l<sup>-1</sup>, y c) polivinilpirrolidona (PVP) 250 ó 500 mg l<sup>-1</sup>. Los cultivos se incubaron en condiciones

de oscuridad total ó con luz (luz fluorescente blanca a  $50 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) con un fotoperíodo de 16 horas. Todos los tratamientos se hicieron con 4 repeticiones cada uno.

#### **9.4. Condiciones asépticas**

Las hojas inmaduras y semillas maduras se desinfectaron de manera superficial con una solución jabonosa por 5 min, seguida por una inmersión en etanol al 70% (v/v) por 30 s. Posteriormente, a baja y con agitación constante, las hojas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% (v/v) por 15 min, agregando tres gotas de Tween-20 por cada 100 ml de solución preparada. Para las semillas usadas como explantes, el tratamiento de desinfección fue un tanto diferente, éstas se sumergieron por 1 h en una solución fúngica de Bravo 720 (tetracloroisofalónitrilo) al 27% (v/v), seguido por una inmersión de hipoclorito de sodio al 4.2% (v/v) durante 1 h.

Posteriormente, en el interior de una campana de flujo laminar (Figura 12), previamente desinfectada, ambos tipos de explantes fueron lavados tres veces con agua destilada esterilizada. Una vez desinfectados, los explantes se cortaron dentro de cajas petri conteniendo solución antioxidante compuesta por ácido cítrico y ácido ascórbico ( $100 \text{ mg l}^{-1} + 150 \text{ mg l}^{-1}$ , respectivamente). Las hojas se cortaron en segmentos de 5 x 5 mm, y las semillas se cortaron en cuatro secciones iguales. Después, los segmentos se sumergieron en soluciones nuevas de antioxidante en vasos de precipitado, realizando 3 cambios periódicos de dicha solución durante 3 o 4 min para eliminar la mayor parte del látex exudado durante los cortes. Finalmente, 3 ó 4 explantes se depositaron en frascos tipo Gerber contenido 25 ml de medio de cultivo, previamente esterilizado.

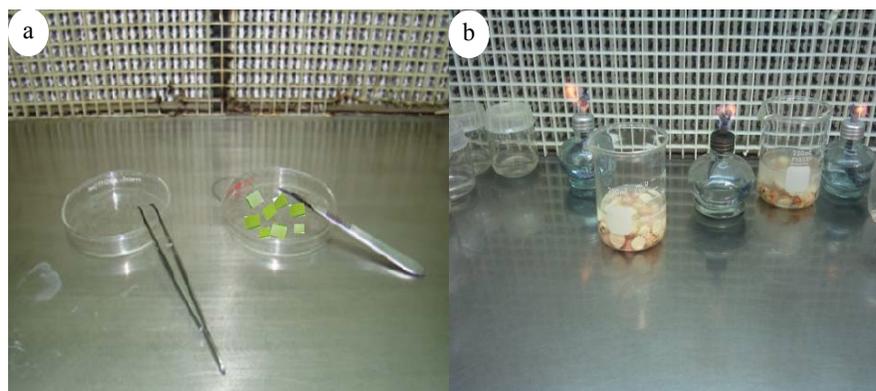


Figura 12. Explantes de *C. brasiliense* inmersos en solución antioxidante previo a la siembra: a) hojas, b) semillas.

### 9.5. Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo utilizado fue el Woody Plant Medium (WPM) de Lloyd y McCown (1981), el cual fue suplementado con 2 % de sacarosa (p/v), 10 mg l<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 150 mg l<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 250 mg l<sup>-1</sup> de PVP, y 0.18% de phytagel (p/v), (Sigma, St. Louis, MO, USA). Todos los cultivos se incubaron a 25 ± 2°C en oscuridad total.

### 9.6. Inducción de callo

Para inducir la respuesta de callo en los explantes, diferentes concentraciones y combinaciones de RCV (citocinina y auxinas) se incorporaron al medio del cultivo: a) KIN (0.00, 0.46, 2.32, 4.65, 6.97, 9.30 y 11.63 μM) + 2,4-D (0.00, 0.45, 2.26, 4.53, 6.8, 9.06 y 11.32 μM) ó + ANA (0.00, 0.53, 2.68, 5.37, 8.05, 11.74 y 13.42 μM); b) BAP (0.0, 4.44 and 8.88 μM) + AIB (9.80, 19.60 y 29.40 μM); c) BAP (8.88 μM) + PIC (8.28, 16.56 y 24.84 μM) ó + ANA (10.74, 21.48 y 32.22 μM); y d) TDZ (0.04, 0.45, 4.54, 13.62 y 27.24 μM). Finalmente, el valor del pH se ajustó a 5.8, y el medio de cultivo se esterilizó a una

temperatura de 121°C durante 18 min. Los explantes de hojas y semillas se evaluaron usando los tratamientos descritos arriba, con excepción del inciso (a), que no fue evaluado en los explantes de semilla. Para cada tratamiento se usaron tres frascos. La respuesta de inducción de callos o raíces desarrollados de los explantes, se expresaron como un porcentaje del total de los explantes evaluados después de 6 o 9 semanas. Los tratamientos que indujeron los mejores porcentajes de callos de explantes de semilla fueron seleccionados como líneas celulares, los cuales se siguieron subcultivando en sus respectivos medios de inducción y RCV. Las transferencias a medio de cultivo fueron realizadas en periodos de 15 días para los primeros cuatro ciclos de subcultivos, posteriormente las transferencias se hicieron cada mes durante 10 ciclos. Después de los ciclos de subcultivo, se realizó el análisis por HPLC para cuantificar la producción de metabolitos de los callos.

### **9.7. Preparación de extractos y muestras para el análisis por HPLC**

Las muestras frescas de hojas y callos se secaron a 60°C en una estufa y posteriormente se pulverizaron. Las muestras secas (500 mg) se extrajeron usando cinco ciclos de hexano por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se filtraron, se mezclaron y se concentraron bajo presión reducida en un Rotavapor (Buchi RE-111; Buchi Laboratoriums-Tecnick AG, Flawil, Switzerland). Las muestras concentradas se secaron por evaporación del disolvente restante a temperatura ambiente. Los compuestos de referencia calanólido B, calanólido C y ácido apetalico fueron proporcionados por el Dr. Ricardo Reyes Chilpa del Instituto de Química de la UNAM. Antes de iniciar el análisis por HPLC, se prepararon soluciones de 0.75 mg ml<sup>-1</sup> de los compuestos de referencia con

acetonitrilo (3 mg/4 ml). Además, con el fin de obtener la curva de calibración, se hicieron diluciones de cada uno de los compuestos de referencia preparados (10, 25, 50 y 100 mg ml<sup>-1</sup>). Cada muestra de biomasa extraída de callos provino de un frasco. Mientras que para las muestras de las hojas de las plantas de invernadero se tomaron 3 hojas diferentes por cada repetición. Ambos tipos de muestras con un total de 3 repeticiones.

### **9.8. Análisis por HPLC**

El contenido de calanólido B, calanólido C y ácido apetalico se determinó en un equipo Waters HPLC equipado con una bomba binaria 1525 (Waters Co., MA, EE.UU), una columna C18 kromasil (250 x 3 mm, tamaño de partícula 5 µm) y un detector de absorción de doble longitud de onda (2487 DWAD) (Waters Co., MA, USA). La fase móvil consistió de una mezcla de acetonitrilo (60%) y agua (40%), la cual se bombeo isocráticamente durante 45 min a un flujo de 1 ml por min. La detección se realizó utilizando una longitud de onda de 284 nm con DWAD. El volumen de inyección fue de 20 µl. Las muestras y los compuestos de referencia se analizaron de la misma forma. Cada solución preparada se pasaron por un filtro de nylon de 0.45 µm (Acrodisc, 25 mm Syringe Filter), antes de ser inyectada. Para procesar los datos cromatográficos se usó el software Waters Breeze 3.3. Para identificar y cuantificar los calanólidos y el ácido apetalico de las muestras, se utilizaron los datos de los respectivos tiempos de retención y las áreas de los picos de las curvas de calibración. Cada muestra se inyectó tres veces.

## **9.9. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se usó el software SAS 9.0 (SAS Institute Inc, 2002). Los datos obtenidos de los porcentajes de inducción callos y la cuantificación de calanólidos y el ácido apetalico se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), seguido por una prueba de comparación de medias múltiple Tukey-Kramer. Los valores de P menores de 0.05 se consideraron como significativos. Cada tratamiento se realizó con al menos tres repeticiones.

## **10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **10.1. Establecimiento de plántulas**

Se estima que los frutos colectados tenían aproximadamente un mes de maduración, puesto que tenían una coloración amarillenta (característica de madurez). Además, otra cantidad de semillas (sin mesocarpio) fueron recolectadas directamente del suelo. Estas características pudieron haber influido en el bajo porcentaje de germinación obtenido (36%). Por otra parte, se menciona que las temperaturas en donde se desarrolla ésta especie oscilan entre 25 y 28 °C (Flores 2002). Además, para obtener una mejor germinación y establecimiento de plántulas de *C. brasiliense* la temperatura optima debe ser de 30°C (Nery et al. 2007). Este mismo autor menciona que las cubiertas seminales como el endocarpio y/o el tegumento no influyen estadísticamente en la germinación, pero hay una tendencia a reducirla si la semilla es sembrada con alguno de estas cubiertas. En relación a esto, las semillas en el presente trabajo fueron sembradas sin cubiertas seminales, pero no hubo un control sobre las temperaturas en el invernadero, lo que cual pudo también haber influido en el porcentaje de germinación.

La emergencia radicular ocurrió aproximadamente a los 20 días y el epicotilo apareció a los 44 días después de la siembra como se muestra en la Figura 13.

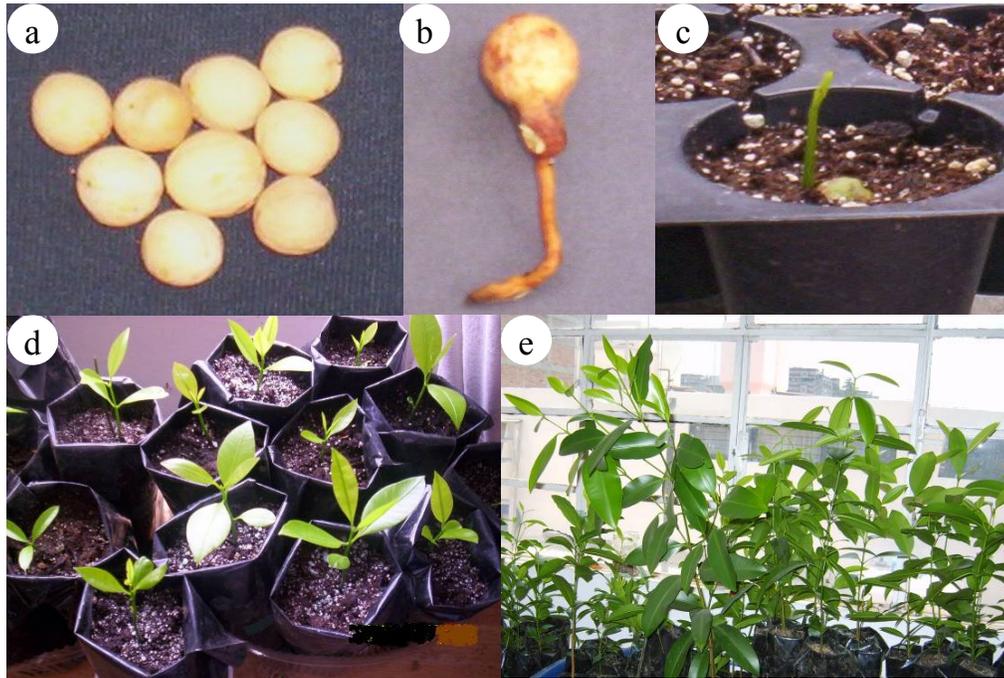


Figura 13. Establecimiento de plántulas de *C. brasiliense* en invernadero. a) semilla sin cubierta, b) emergencia radicular a los 20 días, c) emergencia epicotiledonar a los 44 días, d) plántulas de 3 meses de edad, y e) plántulas de un 1 año de edad.

## 10.2. Evaluación de compuestos antioxidantes y medios de cultivo

Durante el establecimiento de cultivos asépticos (sin reguladores de crecimiento), se observó una apariencia de color marrón oscuro en todos los explantes después de 1 semana del cultivo. A las dos semanas, todos los explantes murieron. Para tratar de disminuir este problema, se realizaron subcultivos frecuentes. Sin embargo, esta técnica no evitó completamente el problema de oxidación de los explantes, tal como lo encontrado por Fett-Neto et al. (1992). El ácido cítrico y ácido ascórbico, se usan como antioxidantes, en tanto

que el carbón activado, posee una red muy fina de poros, con una gran superficie interna, en la cual puede absorber todo tipo de sustancias como son: pigmentos tóxicos, marrones, y negros (compuestos de tipo polifenol oxidados y taninos), pero también puede absorber a los RCV, vitaminas, y algunos minerales como Zn, Fe, etc. Las concentraciones de uso del carbón activado van de 0.2-3% p/v (Pierik 1990). El PVP es un polímero, que al ser adicionado al medio en concentraciones de 250-1000 mg l<sup>-1</sup> absorbe sustancias de tipo fenólico (Johansson 1983; Tomas 2008).

Se observó una clara diferencia de los tratamientos, siendo la condición de oscuridad en la que se presentó la mayor supervivencia de los explantes, principalmente cuando se adicionaron 250 mg l<sup>-1</sup> de PVP al medio de cultivo, obteniendo un 87.5% de supervivencia (Figura 14). Es probable que los metabolitos secundarios, como las cumarinas, u otros compuestos producidos por *C. brasiliense*, hayan sido liberados de la vacuola debido a las heridas de la hoja (Buchanan et al. 2000, lo que pudo ser toxico a los explantes; Wink 1997). Se sabe también que, las condiciones de crecimiento óptimo de los cultivos *in vitro* dependen de las condiciones nutricionales, y que pueden variar entre especies (Bhojwani y Razdan 1983). En cuanto a los medios de cultivo utilizados, se observó que el WPM fue el que tuvo el mejor efecto sobre el crecimiento de los explantes. Estos explantes mostraron un aspecto liso, suave, con alargamiento y mantuvieron su coloración verdosa. Por el contrario, en los explantes cultivados en los otros medios de cultivo (B5 y MS), se observó un aspecto duro, quebradizo y sin crecimiento o alargamiento. Por lo tanto, el WPM se seleccionó como el medio de cultivo más apropiado para *C. brasiliense* en la inducción de callo con RCV. Estos resultados son similares a los publicados por Pawar et al. (2007) en *C. inophyllum* quien encontró que con el WPM encontró una mejor respuesta en la inducción de callos.

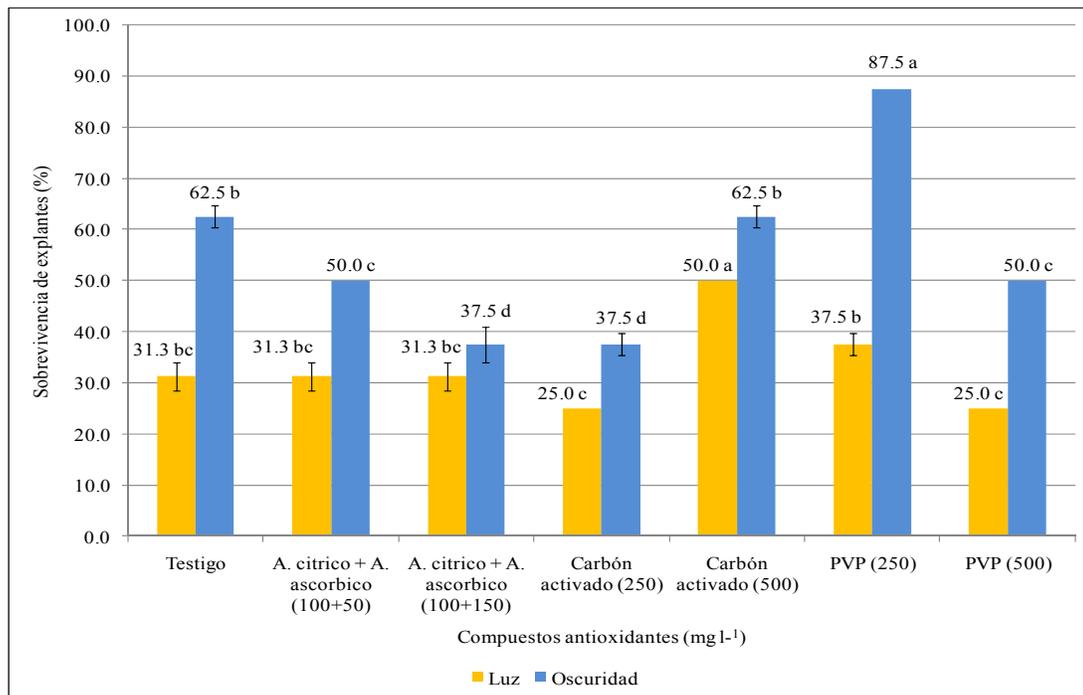


Figura 14. Porcentaje de sobrevivencia de explantes de hoja de *C. brasiliense* con diferentes compuestos antioxidantes y condiciones de incubación. Media  $\pm$  DS con la misma letra en barras del mismo color no son estadísticamente diferentes al nivel de 5% de probabilidad.

### 10.3. Inducción de cultivos callo

Cuando se analizó el efecto de RCV, se observó que el tratamiento del control (sin reguladores de crecimiento), no tuvo inducción de callo o alguna respuesta en los explantes de hoja o de semilla, los cuales se observaron de aspecto quebradizo y sin crecimiento (Figura 15a, 16a), en tanto que otros tratamientos con RCV indujeron respuesta a callo y en algunos indujeron rizogénesis directa. En los explantes de hoja, los tratamientos donde se combinó KIN + (2,4-D ó ANA) favorecieron la inducción de callo a partir de los 40 días de cultivo. El tratamiento con KIN + 2,4-D indujo un callo verde friable, que se observó en toda la superficie de los explantes de hoja (Figura 15b). Después de 2 semanas, los callos

se tornaron de un aspecto amarillento (Figura 15c). El tratamiento con KIN + ANA indujo un callo de aspecto compacto y blanco (Figura 15d) o raíz (Figura 15e) en los bordes de corte del explante. En tanto que la raíces inducidas de los explantes de hoja dieron origen a callo semifriable de color café, (Figura 15f) después de 3 semanas (61 días de cultivo).

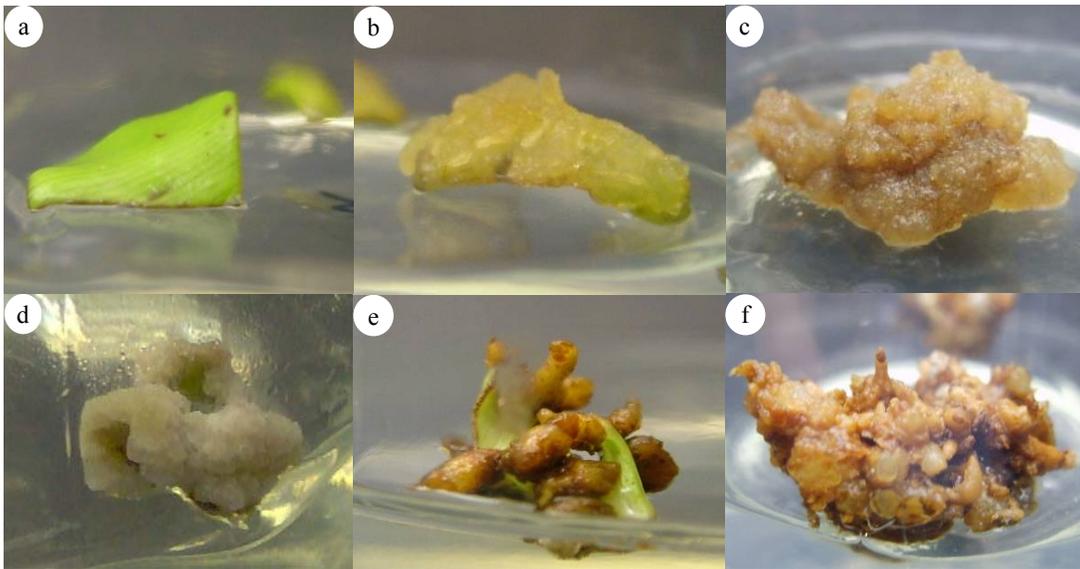


Figura 15. Respuestas inducidas de callo y raíz en explantes de hoja de *C. brasiliense*, bajo tratamientos de RCV: a) Explantes sin reguladores (control); b) callo verdoso friable inducido de explantes de hoja con KIN 4.65  $\mu\text{M}$  + 2,4-D 4.53  $\mu\text{M}$  después de 40 días de cultivo; c) callo desarrollado a partir de (a), dos semanas después; d) callo compacto; e) rizogénesis directa en explantes de hoja con KIN 0.46  $\mu\text{M}$  + ANA 5.37  $\mu\text{M}$ , después de 40 días de cultivo; f) callo semifriable desarrollado a partir de (e), tres semanas después.

En términos generales, las auxinas 2,4-D o ANA tuvieron un mayor efecto que las citoquininas sobre la inducción de callo en los explantes de hoja (Tabla 4). Por otra parte, cuando se comparó el efecto de la inducción de callo entre las auxinas 2,4-D y ANA, no se encontraron diferencias estadísticas entre éstas. En las tres concentraciones bajas de 2,4-D o ANA (0.45, 2.26 y 4.53  $\mu\text{M}$  o 0.53, 2.68 y 5.37  $\mu\text{M}$ , respectivamente), evaluadas como la

única fuente de RCV, los explantes de hoja mostraron una inducción de callo de 50-67% (Tabla 4). Cuando se evaluaron las tres concentraciones más bajas de KIN (0.46, 2.32 y 4.65  $\mu\text{M}$ ) sin auxina, hubo porcentajes de inducción de callo de 29-35.25% en los explantes de hoja (Tabla 4). Estos resultados pueden deberse al hecho de que las auxinas están implicadas en muchos aspectos del proceso de crecimiento y desarrollo de las plantas (Benjamins y Scheres 2008; Vanneste y Friml 2009). El tratamiento con 4.65  $\mu\text{M}$  de KIN tuvo una influencia significativa en la formación de callo, una respuesta que ocurrió en cada concentración evaluada de la auxina 2,4-D (Tabla 4). Sin embargo, la inducción de callo más alta (80.67%) se obtuvo cuando la KIN se combinó con ANA en concentraciones de 0.46  $\mu\text{M}$  y 5.37  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Tabla 4). Además, estos callos mostraron un mejor desarrollo que a los obtenidos con los tratamientos de KIN + 2,4-D (Tabla 4). Los tratamientos con KIN + (2,4-D ó ANA) que indujeron los mayores porcentajes de callo en explantes de hoja fueron evaluados para los explantes de semilla, sin embargo, no se observó ninguna respuesta. Se esperaba que los explantes de semilla produjeran significantes porcentajes de inducción de callo como se observó en los explantes de hoja, ya que las células pertenecientes a las semillas están menos diferenciadas que las de hojas. Debido a la insatisfactoria respuesta de inducción obtenidas en los explantes de semilla y debido al escaso material vegetal, no se hicieron más intentos con el resto de los tratamientos de KIN, 2,4-D y ANA (inciso a).

Tabla 4. Porcentaje de inducción de callo en explantes de hojas inmaduras de *C. brasiliense* Cambes con diferentes concentraciones y combinaciones de KIN y 2,4-D ó KIN y ANA después de seis semanas de cultivo.

RCV ( $\mu$ M)		Inducción de callo (%)	RCV ( $\mu$ M)	
KIN	2,4-D		ANA	Inducción de callo (%)
0	0	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>	0	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
0	0.45	52.84 $\pm$ 4.01 <sup>fg</sup>	0.53	54.25 <sup>R</sup> $\pm$ 6.01 <sup>fg</sup>
0	2.26	67.00 $\pm$ 0.00 <sup>bcd</sup>	2.68	62.50 $\pm$ 5.89 <sup>de</sup>
0	4.53	50.00 $\pm$ 0.00 <sup>fg</sup>	5.37	50.00 $\pm$ 0.00 <sup>fg</sup>
0.46	0	29.00 $\pm$ 5.66 <sup>ij</sup>	0	29.00 $\pm$ 5.66 <sup>ij</sup>
0.46	0.45	71.00 $\pm$ 5.66 <sup>bc</sup>	0.53	50.00 $\pm$ 0.00 <sup>fg</sup>
0.46	2.26	52.84 $\pm$ 4.01 <sup>fg</sup>	2.68	64.00 $\pm$ 3.77 <sup>cd</sup>
0.46	4.53	47.17 $\pm$ 4.01 <sup>g</sup>	5.37	80.67 <sup>R</sup> $\pm$ 3.77 <sup>a</sup>
2.32	0	35.25 $\pm$ 3.18 <sup>hi</sup>	0	35.25 $\pm$ 3.18 <sup>hi</sup>
2.32	0.45	66.85 $\pm$ 0.24 <sup>bcd</sup>	5.37	37.34 $\pm$ 6.13 <sup>h</sup>
2.32	2.26	62.67 $\pm$ 6.13 <sup>de</sup>	8.05	50.00 $\pm$ 0.00 <sup>fg</sup>
2.32	9.06	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>	11.74	25.00 $\pm$ 0.00 <sup>j</sup>
2.32	11.32	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>	13.42	57.00 $\pm$ 1.88 <sup>ef</sup>
4.65	0	33.00 $\pm$ 0.00 <sup>hi</sup>	0	33.00 $\pm$ 0.00 <sup>hi</sup>
4.65	0.45	52.67 $\pm$ 3.77 <sup>fg</sup>	0.53	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
4.65	2.26	64.75 $\pm$ 3.18 <sup>cd</sup>	2.68	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
4.65	4.53	72.34 $\pm$ 2.12 <sup>b</sup>	5.37	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
4.65	6.80	50.00 $\pm$ 0.00 <sup>fg</sup>	8.05	57.00 $\pm$ 1.88 <sup>ef</sup>
4.65	9.06	29.00 $\pm$ 5.66 <sup>ij</sup>	11.74	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
4.65	11.32	37.34 $\pm$ 6.13 <sup>h</sup>	13.42	50.00 $\pm$ 0.00 <sup>fg</sup>
6.97	4.53	37.34 $\pm$ 6.13 <sup>h</sup>	0.53	25.00 $\pm$ 0.00 <sup>j</sup>
6.97	6.80	25.00 $\pm$ 0.00 <sup>j</sup>	2.68	64.75 $\pm$ 3.18 <sup>cd</sup>
6.97	9.06	25.00 $\pm$ 0.00 <sup>j</sup>	5.37	64.75 <sup>R</sup> $\pm$ 3.18 <sup>cd</sup>
6.97	11.32	25.00 $\pm$ 0.00 <sup>j</sup>	11.74	50.00 $\pm$ 0.00 <sup>fg</sup>
9.30	0.45	66.84 $\pm$ 0.24 <sup>bcd</sup>	2.68	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
9.30	2.26	66.84 $\pm$ 0.24 <sup>bcd</sup>	5.37	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
9.30	4.53	57.00 $\pm$ 1.88 <sup>ef</sup>	8.05	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>k</sup>
9.30	6.80	37.34 $\pm$ 6.13 <sup>h</sup>	11.74	25.00 $\pm$ 0.00 <sup>j</sup>
11.62	4.53	37.34 $\pm$ 6.13 <sup>h</sup>	0.53	37.50 $\pm$ 5.89 <sup>h</sup>
11.62	6.80	25.00 $\pm$ 0.00 <sup>j</sup>	2.68	67.00 $\pm$ 0.00 <sup>bcd</sup>
11.62	9.06	25.00 $\pm$ 0.00 <sup>j</sup>	5.37	64.75 <sup>R</sup> $\pm$ 3.18 <sup>cd</sup>

Solo se presentan los tratamientos que fueron capaces de inducir la formación de callo.

Las combinaciones usadas de KIN y 2,4-D ó ANA fueron establecidas usando un diseño factorial (7x7x2).

Media  $\pm$  DS con la misma letra en las columnas no son estadísticamente diferentes al nivel de 5% de probabilidad; media seguida por el superíndice "R" indica que el callo inducido se desarrollo de raíz.

Debido a que ninguna investigación sobre cultivos de tejidos vegetales para la producción de metabolitos secundarios ha sido reportada en *Calophyllum brasiliense*, la citocinina KIN, y las auxinas 2,4-D y ANA fueron inicialmente seleccionadas para la investigación de callo, debido a que son los más activos y comúnmente son empleados para establecer cultivos de tejidos (Staba 1982). Sin embargo, éstos primeros resultados, no fueron tan satisfactorios como se esperaba. Estos callos, desarrollados a partir de los tratamientos que generaron el mayor porcentaje de inducción (KIN 0.46  $\mu$ M + ANA 5.37  $\mu$ M), mostraron un crecimiento lento cuando se subcultivaron. Por lo tanto, se decidió establecer tratamientos con otros RCV utilizando también combinaciones de citocininas y auxinas [b) BAP + AIB, c) BAP + PIC o ANA, y d) TDZ] para evaluar explantes de semilla y hoja. De acuerdo a los nuevos tratamientos (b ó c) utilizados para la inducción, el callo apareció en toda la superficie de los explantes de hoja y semilla. De igual forma, la respuesta ocurrió después de los 40 días de cultivo en los explantes de hoja, y se desarrolló un callo blanco y compacto similar a lo observado en los tratamientos con KIN + ANA (Figura 15d), mientras que en los explantes de semilla inicialmente se formó un callo blanco y friable a los 10 días (Figura 16b), y dos semanas después (aproximadamente 20 días de inicio del cultivo) se volvió de un color más amarillento (Figura 16c) y después de 30 días, éste se torno a un color café claro y de aspecto semifriable (Figura 16d).

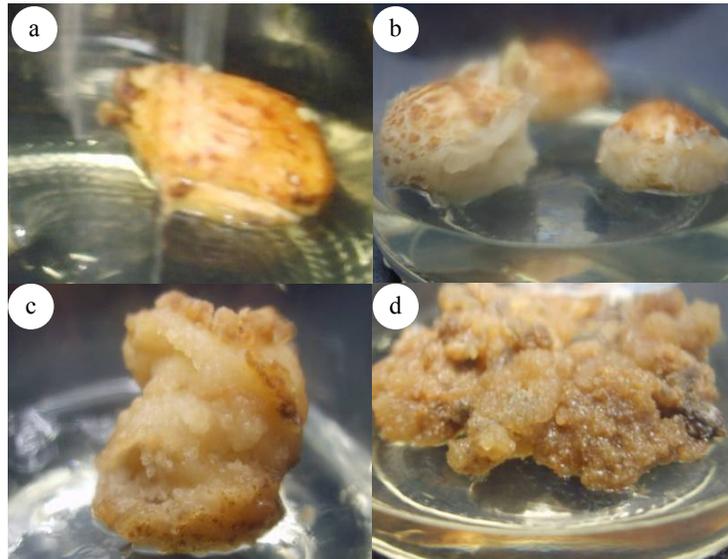


Figura 16. Respuestas inducidas de callo en explantes de semilla de *C. brasiliense*, con BAP 8.88  $\mu\text{M}$  + PIC 24.84  $\mu\text{M}$ . a) Explante sin reguladores (control); b) a los 10 días; c) a los 20 días; y d) después 30 días de cultivo, respectivamente.

Los tratamientos con BAP + AIB (tratamientos b) mostraron una inducción de callo pobre, y se presentó sólo en dos tratamientos en los explantes de hoja y con bajos porcentajes, mientras que en los explantes de semilla no hubo respuesta (Tabla 5). Después del tratamiento con 19.6  $\mu\text{M}$  de AIB se observó la inducción de callo del 29.17%, y al combinar este RCV con 4.44  $\mu\text{M}$  de BAP el porcentaje de callo aumentó a 33.33% (Tabla 5). En los tratamiento posteriores con una combinación de BAP + PIC ó ANA (tratamiento c), se observó que la adición de la auxina PIC indujo una mayor producción de callo en comparación con ANA en los explantes de hoja o semilla (Tabla 6). Para los tratamientos con BAP + PIC, se observó un mayor porcentaje de inducción de callo en los explantes de semilla en comparación con los explantes de hoja (Tabla 6). La inducción de callo más alta (100%) se produjo en los explantes de semilla tratados con BAP 8.88  $\mu\text{M}$  + PIC 24.84  $\mu\text{M}$

(Tabla 6). Observaciones similares fueron hechas por Pawar et al. (2007) en *Calophyllum inophyllum*, quien encontró una inducción de callo del 86.66% en los explantes de semilla mediante la aplicación de concentraciones similares de BAP + PIC. Las células vegetales son totipotentes, y las respuestas de inducción dependen de la edad del explante (Bhojwani y Razdan 1983; Pierik 1990). Por lo tanto los explantes de semillas pueden producir mayor porcentaje de callo.

Tabla 5. Porcentaje de inducción de callo en explantes de hoja inmadura y semilla madura de *C. brasiliense*, bajo diferentes concentraciones y combinaciones de BAP + IBA después de 6 semanas de cultivo.

RCV ( $\mu\text{M}$ )		Inducción de callo (%)	
BAP	AIB	Explantes	
		Hojas	Semilla
0	4.9	$0.00 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^c$
0	19.6	$29.17 \pm 5.89^b$	$0.00 \pm 0.00^c$
0	29.4	$0.00 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^c$
4.44	4.9	$0.00 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^c$
4.44	19.6	$33.33 \pm 0.00^a$	$0.00 \pm 0.00^c$
4.44	29.4	$0.00 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^c$
8.88	4.9	$0.00 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^c$
8.88	19.6	$0.00 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^c$
8.88	29.4	$0.00 \pm 0.00^c$	$0.00 \pm 0.00^c$

Media  $\pm$  DS con la misma letra en columnas no son estadísticamente diferentes al nivel de 5% de probabilidad.

Tabla 6. Porcentaje de inducción de callo en explantes de hoja inmadura y semilla madura de *C. brasiliense* bajo diferentes concentraciones y combinaciones de BAP + PIC y BAP + ANA después de 6 semanas de cultivo.

RCV ( $\mu\text{M}$ )		Inducción de callo (%)	
BAP	PIC	Explantes	
		Hojas	Semillas
8.88	8.28	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	87.50 $\pm$ 6.36 <sup>b</sup>
8.88	16.56	54.17 $\pm$ 5.89 <sup>c</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>
8.88	24.84	5.00 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	100.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
BAP	ANA		
8.88	10.74	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>
8.88	21.48	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>
8.88	32.22	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>

Media  $\pm$  DS con la misma letra en columnas no son estadísticamente diferentes al nivel de 5% de probabilidad.

Con el fin de comparar el efecto de las auxinas AIB, PIC y ANA en la inducción de callo de los explantes de hojas y semillas, se analizaron los resultados obtenidos de los tratamientos b y c. Se observaron diferencias significativas entre las auxinas para estos explantes. De todas las auxinas, el PIC mostró el mayor número de tratamientos con inducción de callo en ambos explantes, mientras que el AIB y ANA no mostraron diferencias significativas. Por otra parte, los explantes de hoja y semilla fueron comparados para evaluar el efecto del tipo de explantes en la inducción de callo, y no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Las hojas jóvenes se evaluaron de manera más extensiva que las semillas ya que las hojas son más fáciles de adquirir, y tienen menor contenido microbiano en su superficie (Cassells 1997).

Por otra parte, cuando el TDZ se aplicó como tratamiento de RCV (experimento d), los resultados no mostraron inducción de callo en ambos tipos de explantes. El hecho de que el TDZ se aplicó como única fuente de RCV se debe a que es un regulador que actúa como auxina ó citocinina, de acuerdo a las concentraciones utilizadas (Murthy et al. 1998).

Debido a que los porcentajes más altos de callo friable se registraron en los explantes de hoja (CH) con los tratamientos de KIN 0.46  $\mu\text{M}$  + ANA 5.37  $\mu\text{M}$  y en los explantes de semilla (CS), con BAP 8.88  $\mu\text{M}$  + PIC 24.84  $\mu\text{M}$  se observó un mejor crecimiento en comparación con los otros tratamientos. Los cultivos derivados de estos tratamientos fueron seleccionados y mantenidos a través de los subcultivos. Ambos tipos de callos (CH y CS) se cosecharon después de haberse mantenido en subcultivos frecuentes durante 1 año. Este es el período de tiempo recomendado para la etapa de mantenimiento antes de realizar un análisis fitoquímico, ya que podría ocurrir variación somaclonal en los callos, lo cual puede afectar la producción de metabolitos secundarios (Bourgau et al. 2001).

#### **10.4. Producción de calanólidos y ácido apetalico**

Una vez estandarizada la metodología para cuantificar los compuestos de referencia (calanólido B, calanólido C y ácido apetalico) por HPLC, se observó que, el tiempo de retención ( $T_r$ ) para el calanólido B fue a los 31.56 min ( $T_r = 31.56$  min) (Figura 17), para el calanólido C ( $T_r = 32.87$  min) (Figura 18), y para el ácido apetalico ( $T_r = 25.90$  min) (Figura 19).

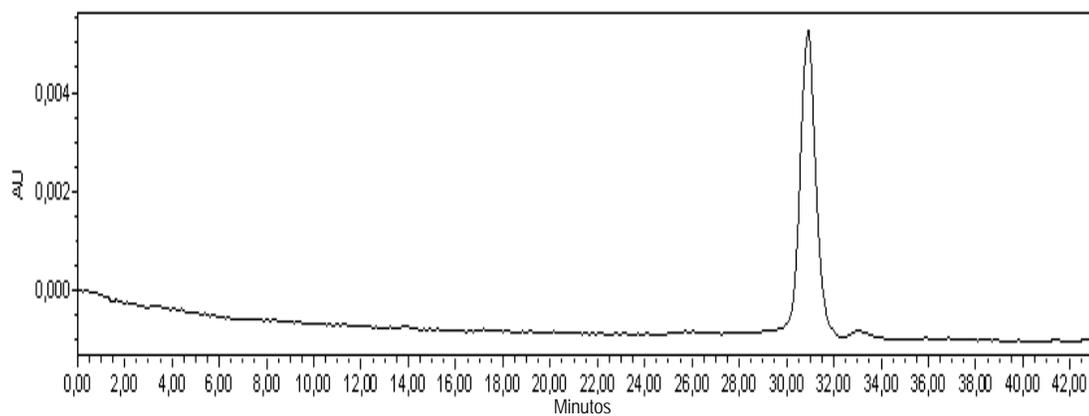


Figura 17. Cromatograma por HPLC del calanólido B (Tr=31.56).

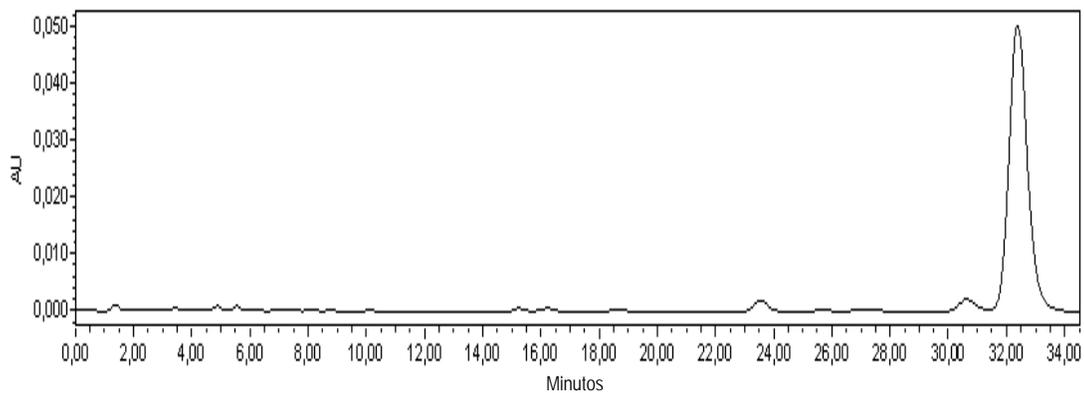


Figura 18. Cromatograma por HPLC del calanólido C (Tr=32.87).

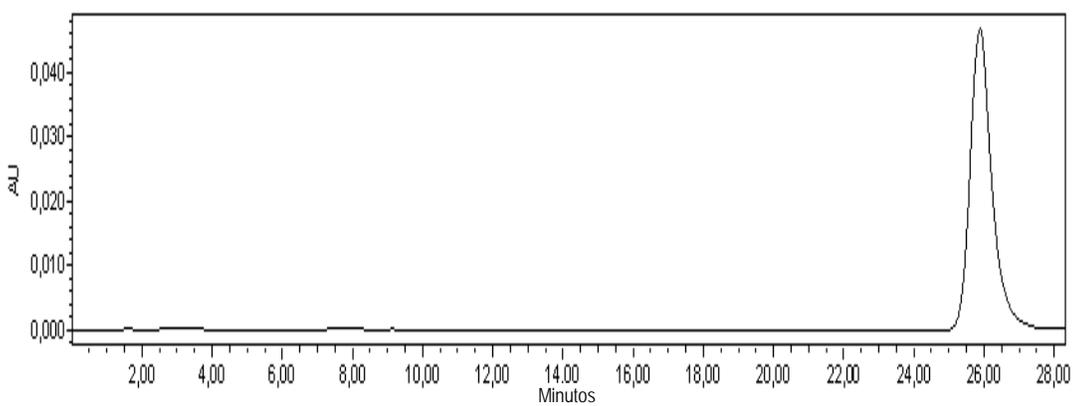


Figura 19. Cromatograma por HPLC del ácido apetélico (Tr=25.90).

Posteriormente se analizaron las muestras de los extractos hexánicos de callos de semilla y de hojas, y de hojas de las plantas de invernadero. Se observó que los callos provenientes de los explantes de semilla (CS) fueron los mejores productores de metabolitos secundarios en comparación con los obtenidos de los callos de hoja (CH) (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis cuantitativo de calanólidos y ácido apetalico en extractos hexánicos de cultivos de callo y muestras de hoja de *C. brasiliense*.

Compuestos	Tr (min)	Contenido de metabolitos (mg kg <sup>-1</sup> PS)		
		Muestras		
		Hojas	Cultivos de callo	
		Plantas de invernadero	Callo de hoja (CH)	Callo de semilla (CS)
Calanolido B	31.56	1040.71 ± 13.87 <sup>a</sup>	8.70 ± 1.95 <sup>c</sup>	309.25 ± 42.48 <sup>b</sup>
Calanolido C	32.87	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	117.70 ± 9.07 <sup>a</sup>
Ácido apetalico	25.90	1425.02 ± 4.53 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	30.98 ± 1.07 <sup>b</sup>

Media ± DS con la misma letra dentro de una fila no son estadísticamente diferentes al nivel de 5% de probabilidad (n=3).

El calanolido B, el calanólido C y el ácido apetalico fueron identificados en las muestras de extractos hexánicos de CS (Figura 20), mientras que solamente el calanólido B se detectó en CH (Tabla 7, Figura 21). Además, en CS se detectó 35.54 veces mayor concentración de calanólido B en comparación con CH (Tabla 7). El calanólido B fue la cumarina que se produjo en mayor concentración en CS (309.25 mg kg<sup>-1</sup> PS), seguido por el calanólido C (117.70 mg kg<sup>-1</sup> PS) y el ácido apetalico (30.98 mg kg<sup>-1</sup> PS) (Tabla 7).

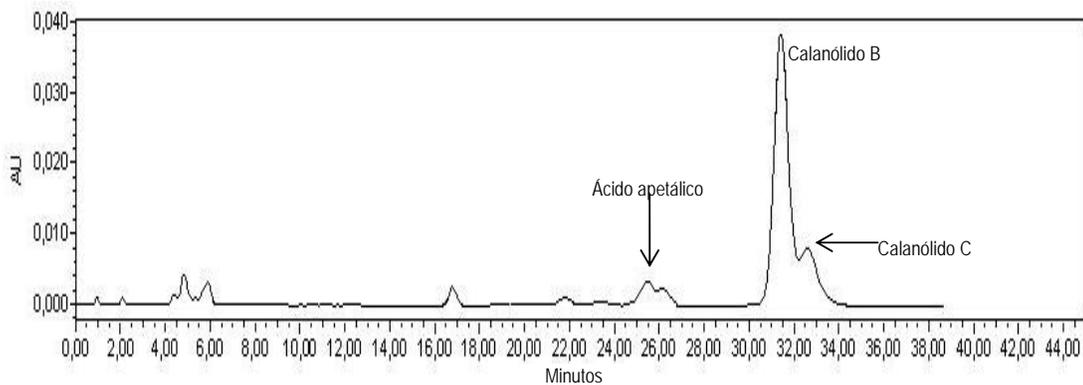


Figura 20. Cromatograma por HPLC de extractos de callo de semilla (CS).

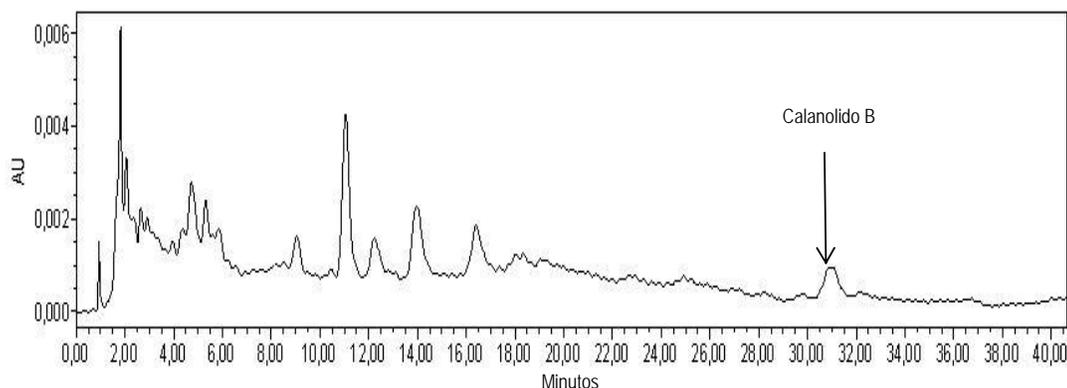


Figura 21. Cromatograma por HPLC de extracto de callo de hoja (CH).

Concentraciones similares fueron obtenidas en cultivos de callos de *C. inophyllum* en la producción de dipiranocumarinas anti-VIH-1 RT (405.9 mg kg<sup>-1</sup> PF de inofilum B y 1413,50 mg kg<sup>-1</sup> de inofilum P PF) (Pawar et al. 2007). El calanolido A no se evaluó en el presente estudio debido a que el compuesto de referencia se agotó en estudios previos. Por otra parte, al inicio de los cromatogramas de CS y CH, se observaron otros picos de menor tamaño, de compuestos no identificados, ya que en los estudios fitoquímicos de *C. brasiliense* aún no se han concluido. Por ejemplo, Mckee et al. (1996) encontró nuevas piranocumarinas en *C. lanigerum* y *C. teysmannii*.

El patrón de producción de cumarinas fue diferente para CS y CH. Las cantidades de calanólidos producidos en CS fueron mayores que en CH, debido posiblemente al efecto de los RCV o al crecimiento. Pawar y Thengane (2009) han demostrado que los RCV afectan el crecimiento y la expresión de las dipiranocumarinas en cultivos de células en suspensión de *C. inophyllum*. Encontrar diferencias significativas en la producción de cumarinas entre CS y CH, permite mostrar la importancia de las condiciones de incubación, medios de cultivo, fuente de explante y el tipo de RCV, en los estudios inducción, selección y establecimiento de líneas celulares de cultivos de callo.

También se analizaron por cromatografía extractos de hojas de las plántulas (menor de 1 metro del altura) de invernadero y se observó que el calanólido B y el ácido apetalico fueron producidos en mayores concentraciones, pero no se observó el calanólido C (Tabla 7, Figura 22). Además, la producción del calanólido B y el calanólido C FCS fue de aproximadamente 3.4 y 3.9 veces mayor que los reportados para la planta silvestre (Huerta-Reyes et al. 2004). Las plantas provenientes de invernadero estuvieron sometidas a estrés biótico cuando se cosecharon, pues presentaron evidencia de ataques por hongos cuando los extractos se prepararon.

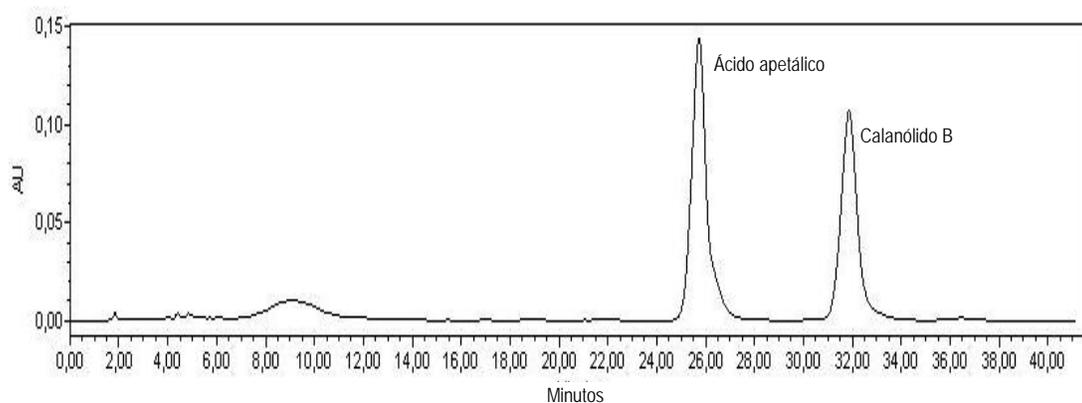


Figura 22. Cromatograma por HPLC de extracto de hojas de plantas de invernadero.

El hecho de registrarse mayor producción de cumarinas en hojas estresadas, podría estar asociado con la producción secundaria, ya que se incrementa bajo condiciones de estrés biótico y abiótico (Ramachandra y Ravishankar 2002; Taiz y Zeiger 2002). Por tanto, es probable que el calanolido B y el ácido apetalico actuaron como fitoalexinas en *C. brasiliense* (Whitehead y Threlfall 1992). Hay et al. (2003) reporta varias cromononas con actividad antifúngica, compuestos a la cual pertenece el ácido apetalico. Estos autores destacaron que hay un esfuerzo constante de investigación para determinar compuestos no solo con actividad biológica contra el VIH-1, sino también contra bacterias patógenas u hongos, especialmente en pacientes inmunodeficientes.

Los resultados mostraron que los cultivos de callo pueden representar una posible fuente biológica para la producción de calanolidos. Con el fin de aumentar la producción, se podrían evaluar varias estrategias. En primer lugar, y debido a que no fue un objetivo de este trabajo, es necesario establecer un cultivo de células en suspensión con el fin de caracterizar el crecimiento y la producción de calanolidos. Esto nos permitirá tener un mejor control de la manipulación, tal y como fue observado en los estudios realizados en *Calophyllum inophyllum*, en el cual se demostró la producción de dipiranocumarinas anti-VIH en cultivos de callos y en cultivos de células en suspensión (Pawar, et al. 2007; 2009). Además, se ha reportado que a través de la optimización de las condiciones del cultivo pueden obtenerse concentraciones más altas de metabolitos secundarios en cultivos de células en suspensión, comparados con las plantas silvestres (Mulabagal y Tsay 2004). Es probable que la elicitación biótica represente una opción adecuada para incrementar el contenido de calanolidos. Además, se deben considerar otras estrategias para mejorar la producción; por ejemplo, el aumento de la concentración de carbono, que ha sido señalada

como una estrategia de éxito para el ácido rosmarínico en *Coleus blumei* y algunos alcaloides en *Catharanthus roseus* (Knobloch y Berlín 1980; Misawa 1985).

## 11. CONCLUSIONES

El WPM fue el medio más adecuado para el establecimiento de cultivos de callo, principalmente en los cultivos derivados de explantes de semilla.

Las condiciones de oscuridad favorecieron el desarrollo de los cultivos en comparación con aquellos expuestos a condiciones de luz.

La mayor inducción de callo de *C. brasiliense* (100%) se produjo en los explantes de semilla tratados con BAP 8.88  $\mu\text{M}$  + PIC 24.84  $\mu\text{M}$  (CS), mientras que para los explantes de hoja ocurrió en el tratamiento con KIN 0.46  $\mu\text{M}$  + ANA 5.37  $\mu\text{M}$  (CH) (80.67%). Los callos que se desarrollaron a partir de estos tratamientos mostraron un mejor crecimiento después de un año de mantenimiento, y por lo tanto se analizaron por HPLC.

El cultivo de CS fue el mejor para la producción de cumarinas en comparación con el cultivo de CH, produciendo calanólido B en cantidades de 309.25 mg kg<sup>-1</sup> PS, calanólido C 117.70 mg kg<sup>-1</sup> PS y ácido apetalico 30.98 mg kg<sup>-1</sup> PS.

El cultivo de CS es una alternativa viable para la producción de metabolitos secundarios, que ofrece la posibilidad de aplicar otras técnicas para aumentar la acumulación de estos compuestos importantes.

Actualmente no existe alguna investigación relacionada con la detección de calanólidos en cultivos de tejidos de *C. brasiliense*, por lo que éste estudio es un paso inicial para la

investigación en la producción del calanólido B y calanólido C en cultivo de tejidos de *C. brasiliense*.

## **12. PERSPECTIVAS**

Debido al poco crecimiento que tuvieron los cultivos de callos en *C. brasiliense* Cambes, es necesario realizar estudios más profundos sobre la optimización del medio de cultivo, como es en la concentración de la fuente de carbono, nitrógeno, y algunos suplementos orgánicos. Esto con la finalidad de obtener mayor producción de biomasa y poder así, establecer cultivos de células en suspensión, y cultivos elicitados que puedan ayudar a incrementar la producción de calanólidos.

Aunque en este trabajo, no se abordaron objetivos sobre técnicas de micropropagación para ésta especie, es importante recalcar que debido a la deforestación que ocurren año tras año, esta especie, la cual es la única en México, corre el riesgo de disminuir aún más su población o incluso desaparecer si no se toman medidas para su conservación. Para *C. brasiliense*, hasta el momento, no se han reportado estudios sobre la propagación *in vitro* o por otra vía, por lo que realizar algún protocolo para propagarla sería de gran importancia.

### 13. REFERENCIAS

- Aguilar-Bañuelos E (2005) Efecto de los metabolitos secundarios de *Calophyllum brasiliense* en los hongos colonizadores de las hojas: Estudios *in vivo*. Tesis para optar por el grado de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Altman A (1999) Plant biotechnology in the 21<sup>st</sup> century: the challenges ahead. *Electronic Journal of Biotechnology* 2: 51-55.
- Balunas MJ & Kinghorn AD (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78:431-441
- Barba AA, Luna RBS, Romero AJ (2001) Micropropagación de plantas. Editorial Trillas. México.
- Barz W & Ellis B (1981) Potential of plant cell cultures for pharmaceutical production. En: Beal JL, Reinhard E (Eds). *Natural Products as Medicinal Agents*. Stuttgart, Hippokrates. pp. 471–507.
- Benjamins R & Scheres B (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 59: 443-465.
- Beyl CA & Sharma GC (1983) Picloram induced somatic embryogenesis in *Gasteria* and *Haworthia*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2: 123-132.
- Bhojwani SS & Razdan MK (1983) *Plant tissue culture*. Elsevier Science. Amsterdam.
- Bosh GP (2003) Biotecnología en el siglo XXI: Retos para México. En: *Claridades Agropecuarias* No. 137. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). México. pp 47-52.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.
- Brenzan MA, Ferreira ICP, Lonardon MVC, Honda PA, Filho ER, Nakamura CV, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Cortez DAG (2008) Activity of extracts and coumarins

from the leaves of *Calophyllum brasiliense* on *Leishmania braziliensis* Pharmaceutical Biology 46: 380-386.

Brenzan MA, Nakamura CV, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Cortez DAG (2007) Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. Parasitology Research 101: 715-722.

Buchanan BB, Grissem W, Jones RL (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plants Physiologists, Maryland, USA.

Buckheit Jr RW, White EL, Fliakas-Boltz V, Russell J, Stup TL, Kinjerski TL, Osterling MC, Weigand A, Bader JP (1999) Unique anti-human immunodeficiency virus activities of the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors calanolide A, costatolide, and dihydrocostatolide antimicrobial. Agents and Chemotherapy 43: 1827-1834.

Calva-Calva G, Esparza GF, Pérez VJ, Martínez JVM, Silva CS y López SC (2002) Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y remoción de xenobióticos. Avances y perspectivas 21: 307-312.

Cardoza V (2008) Tissue culture: The manipulation of plant development. En: Plant biotechnology and genetic: principles, techniques, and applications. CN Stewart Jr (Ed). John Wiley and Sons, Inc. Knoxville, Tennessee. pp. 113-134.

Cassells AC (1997) Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Kluwer, Dordrecht.

Cechinel-Filho V, Meyre-Silva C, Niero R (2009) Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. Chemistry & Biodiversity 6: 313-327.

CENSIDA 2009. Registro nacional de casos de SIDA, al 31 de marzo de 2009. SS/DGE. Disponible vía <http://www.censida.salud.gob.mx/interior/cifras.html>. Revisado el 20 de noviembre de 2009.

- Collins GB, Vian WE, Phillips GC (1978) Use of 4-amino-3, 5, 6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissues. *Crop Science* 18: 286-288.
- Constable F & Vasil IK (1988) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Cell culture in phytochemistry. Vol. 4. Academic Press, New York.
- Constable F, Rambold S, Chatson KB, Kurz WGW, Kutney JP (1981) Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.). *Plant Cell Reports* 1: 3-7.
- Correa MP (1978) Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional Ed., Rio de Janeiro, Brasil.
- Cottiglia F, Dhanapal B, Sticher O, Heilmann J (2004) New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of Natural Products* 67: 537-541.
- Cragg GM & Newman DJ (2003) Plants as a source of anti-cancer and anti-HIV agents. *Annals of Applied Biology* 143: 127-133.
- Cronquist A (1981) An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, Nueva York.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products: secondary metabolites. En: Biochemistry and molecular biology of plants. BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones (Eds). American Society of Plants Physiologists, Maryland USA. pp 1250-1318.
- De Clercq E (1995) Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 200-239.
- Dharmaratne HRW, Tan GT, Marasinghe GP, Pezzuto JM (2002) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Calophyllum* coumarins and xanthenes. *Planta Medica* 68: 86-87.

- Díaz CC (2005). Biotecnología agrícola moderna: Aportaciones del cultivo de tejidos y la ingeniería genética. pp. 27-32. En: Claridades Agropecuarias No. 137. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). México.
- Duke JA & Martinez RV (1994) Amazonian Ethnobotanical Dictionary. CRC Press, Maryland.
- Dweck AC & Meadowsy T (2002) Tamanu (*Calophyllum inophyllum*) – the African, Asian, Polynesian and Pacific Panacea International. Journal of Cosmetic Science 24: 341-348.
- FAO (2000) La biotecnología en la alimentación y la agricultura: Declaración de la FAO sobre Biotecnología. Disponible vía <http://www.fao.org/biotech/stat.asp>. Revisado el 09 de noviembre de 2009.
- Fett-Neto AG, DiCosmo F, Reynolds WF, Sakata K (1992) Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. Biotechnology 10: 1572-1575.
- Flores EM (2002) *Calophyllum brasiliense* Cambess. En: Vozzo JA (Ed.). Tropical tree seed manual. Washington: USDA Forest Service. pp. 353-356.
- Floriani NV, Buffon ID, Cechinel FV (2006) Género *Calophyllum*: importância química e farmacológica. Química Nova 29: 549-554.
- Fonseca MA (2007) Quimiotipos de *Calophyllum brasiliense*: distribución geográfica en México y evaluación de la actividad hipoglucemiente del ácido apetalico. “Tesis para obtener el Título de Biólogo”. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM, México.
- Friday LB & Okano D (2006) Species Profiles for Pacific Island Agroforestry: *Calophyllum inophyllum* (kamani). Disponible vía <http://www.agroforestry.net/tti/Calophyllum-kamani.pdf>.
- Fuller RW, Bokesch HR, Gustafson KR, McKee TC, Cardellina JHII, McMahon JB, Cragg, Soejarto DD, Boyd MR (1994) HIV-inhibitory coumarins from latex of the

- tropical rainforest tree *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4: 1961-1964.
- Fuyita Y & Tabata M (1987) Secondary metabolites from plant cells. En: *Plant tissue and cell culture*. CE Green, DA Somers, WP Hackett, DD Biesboer (Eds). Alan R. Liss, New York. pp. 169-185.
- Gamborg OL & Phillips GC (1995) *Plant cell, tissue, and organ culture: fundamental methods*. Berlin, Springer.
- Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK (1976) Plant tissue culture media. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 12: 473-478.
- Garibay GM, Quintero RR, López-Munguía CA (1993). *Biotecnología alimentaria*. Editorial Limusa. México.
- George EF & Davis W (2008) Effects of the physical environment. En: *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. EF George, MA Hall, GJ De Klerk (Eds). 3ra Edición. Springer. The Netherlands.
- George EF, Hall MA, De Klerk GJ (2008) *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1. The background. 3rd Edition. Published by Springer. The Netherlands.
- Guilet D, Séraphin D, Rondeau D, Richomme P, Bruneton J (2001) Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*. *Phytochemistry* 58: 571-575.
- Gurib-Fakim A (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1-93.
- Habermehl GG & Fliegner W (1998) Terpenes and their biological relevance. En: *Studies in Natural products chemistry*. Atta-ur-Rahman (Ed.), Vol. 20. Elsevier Science. pp. 3-24.
- Harnett SM, Oosthuizen V, Van de Venter M (2005) Anti-HIV activities of organic and aqueous extracts of *Sutherlandia frutescens* and *Lobostemon trigonus*. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 113-119.

- Hay AE, Guilet D, Morel C, Larcher G, Macherel D, Le Ray AM, Litaudon M, Richomme P (2003) Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of pea seeds and new xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Med* 69:1130-1135
- Heldt HW & Heldt F (2005) *Plant biochemistry*. Elsevier Academia Press.
- Huerta-Reyes M, Basualdo MC, Abe F, Jiménez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R (2004) HIV-1 Inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27: 1471-1475.
- Huetteman CA & Preece JE (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 105-119.
- Hurtado MDV & Merino MME (1987) *Cultivo de tejidos vegetales*. Editorial Trillas. México.
- Ito C, Murata T, Itoigawa M, Nakao K, Kaneda N, Furukawa H (2006) Apoptosis inducing activity of 4-substituted coumarins from *Calophyllum brasiliense* in human leukaemia HL-60 cells. *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 58: 975-980.
- Jassim SAA & Naji MA (2003) Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology* 95: 412-427.
- Johansson L (1983) Effects of activated charcoal in anther cultures. *Physiologia Plantarum* 59: 397-403.
- Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW, Cardellina IJH, McMahon JB, Currens MJ, Buckheit RW, Hughes SH, Cragg GM, Boyd MR (1992) The calanolides, a novel HIVinhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *Journal of Medicinal Chemistry* 35: 2735-2743.
- Kimura S, Ito C, Jyoko N, Segawa H, Kuroda J, Okada M, Adachi S, Nakahata T, Yuasa T, Cechinel VF, Furukawa H, Maekawa T (2005) Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum Brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *International Journal of Cancer* 113: 158-165.

- Knobloch KH & Berlin J (1980) Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* (L) G Don. *Zeitschrift für Naturforschung* 35c: 551-556.
- Lindsey K & Jones MGK (1989) *Plant Biotechnology in Agriculture*. Open University Press, Milton Keynes.
- Lloyd G & McCown B (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel by the use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society* 30: 421-426.
- Loyola-Vargas V & Vazquez-Flota F (2006) An introduction to plant cell culture. En: *Plant cell culture protocols*. V Loyola-Vargas, F Vazquez-Flota (Eds). Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 3-8.
- Magis RC, Bravo GE, Gayet SC, Rivera RP, De Luca M (2008) El VIH y el SIDA en México al 2008: hallazgos, tendencias y reflexiones. CENSIDA. México. Disponible vía <http://www.censida.salud.gob.mx>. Revisado el 20 de noviembre de 2009.
- McKee TC, Fuller RW, Covington CD, Cardellina JH, Gulakowski RJ, Krepps BL, McMahon JB, Boyd MR (1996) New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. *Journal of Natural Products* 59: 754-758.
- Merillon JM (2007) Large-scale production in bioreactors. En: *Biotechnology: Secondary metabolites*. KG Ramawat, JM Merillon (Eds). Science Publisher, Enfield, NH, USA. pp. 335-362.
- Mi-Jeong A, Kee-Dong Y, Chul YK, So-Young M, Yong-ung K, Hyun JK, Jeong HK, Cha-Gyun S, Chong-Kyo L, Tae GK, Seung HK, Hoon H, Jinwoong K (2002) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase and antiviral activity of Korean seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology* 14: 325-329.
- Misawa M (1985) Production of useful plant metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 31: 59-88.

- Mukhtar M, Arshad M, Ahmad M, Pomerantz RJ, Wigdahl B, Parveen Z (2008) Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Research* 131 111–120
- Mulabagal V & Tsay HS (2004) Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science, Engineering and Technology* 2: 29-48.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998) Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 34: 267-275.
- Nair LG & Seeni S (2003) In vitro multiplication of *Calophyllum apetalum* (Clusiaceae), an endemic medicinal tree of the Western Ghats. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 75: 169-174.
- Nery FC, de Alveranga AA, Justo CF, de Castro ME, Stein VC (2007) Caracterização morfológica e química de sementes de *Calophyllum brasiliense* Cambess. *Revista Brasileira de Biociências* 5: 144-146.
- Neumann KH, Kumar A, Imani J (2009) *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Niembro RA (1986) *Árboles y arbustos útiles de México. Naturales e introducidos*. Editorial Limusa. México. D.F.
- Niembro RA (1990) *Árboles y arbustos útiles de México*. México DF, Editorial Limusa.
- Oliveira JC (1994) XVII Simposio de plantas medicinais do brasil, Fortaleza, Brasil.
- OMS (2009) *Estadísticas Sanitarias Mundiales*. Disponible vía <http://www.who.int/whosis/whostat/2009/es/index.html>. Revisado el 18 de noviembre de 2009-11-18.

- Ovenden SPB, Yu J, Wan SS, Sberna G, Murray TR, Rhodes D, Cox S, Coates J, Neville GW, Meurer-Grimes BM (2004) Globoidnan A: a lignan from *Eucalyptus globoidea* inhibits HIV integrase. *Phytochemistry* 65: 3255–3259.
- Pan L, De Blanco CEJ, Kinghorn AD (2009) Plant-derived natural products as leads for drug discovery. En: *Plant-derived natural products*. AE Osbourn, V Lanzotti (Eds.). Springer Science. pp. 547-567.
- Papathanasopoulos MA, Hunt GM, Tiemessen CT (2003) Evolution and diversity of HIV-1 in Africa. *Virus Genes* 26: 151-163.
- Patil AD, Freyer AJ, Eggleston DS, Haltiwanger RC, Bean MF, Taylor PB, Caranfa MJ, Breen AL, Bartus HR, Johnson RK, Hertzberg RP, Westley JW (1993) The Inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *Journal of Medicinal Chemistry* 36: 4131-4138
- Pawar KD & Thengane SR (2009) Influence of hormones and medium components on expression of dipyrano-coumarins in cell suspension cultures of *Calophyllum inophyllum* L. *Process Biochemistry* 44: 916-922.
- Pawar KD, Joshi SP, Bhide SR, Thengane SR (2007) Pattern of anti HIV dypiranocoumarin expression in callus cultures of *Calophyllum inophyllum* Linn. *Journal of Biotechnology* 130: 346-353.
- Pennington TD & Sarukhan J (1968) *Arboles Tropicales de México*. United Nations/FAO.
- Pierik RLM (1990) *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Traducido al español por LA. Mateo-Sagasta. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Pina LJA (2008) *Propagación de plantas*. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Piñol MT, Palazon J, Cusidó RM (2000) Introducción al metabolismo secundario. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. J Azcón-Bieto, M Talón (Eds). McGraw-Hill Interamericana, Barcelona, España. pp. 261-283.

- Pretto JB, Cechinel-Filho V, Noldin VF, Sartori MRK, Isaias DEB, Bella CA (2004) Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). *Zeitschrift für Naturforschung* 59c: 657-662.
- Ramachandra RS & Ravishankar GA (2002) Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
- Ramawat KG (2007) Secondary plant products in nature. En: *Biotechnology: Secondary metabolites*. KG Ramawat, JM Merillon (Eds). Science Publisher, Enfield, NH, USA. pp. 21-57.
- Rates SMK (2001) Plants as sources of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.
- Ravishankar GA & Grewal S (1991) Development of media for growth of *Dioscorea deltoidea* cells and *in vitro* diogenin production: influence of media constituents and nutrient stress. *Biotechnology Letters* 13: 125-30.
- Ravishankar GA & Venkataraman LV (1988) Plant cell culture for high value metabolites. *Science Reporter* 7: 379-84.
- Reyes-Chilpa R & Huerta-Reyes ME (2009) Compuestos naturales de plantas de la familia Clusiaceae: Inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *Interciencia* (34): 385- 392
- Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Ramírez-Apan T, Amekraz B, Aumelas A, Jankowski CK, Vázquez TM (2004) Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences* 75: 1635-1647.
- Reyes-Chilpa R, Jiménez-Estrada M, Estrada-Muñiz E (1997) Antifungal xantonas from *Calophyllum brasiliensis* heartwood. *Journal of Chemical Ecology* (23): 1901-1911.
- Robert ML, Arce MM, Eastmond A (1993) Biotecnología vegetal. En: *Biotecnología alimentaria.*, MG Garibay, RR Quintero y CA Lopez-Munguía (Eds). Limusa, Mexico. pp 69-102.

- Rout GR, Samantaray S, Das P (2000) *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* 18: 91-120.
- Rutter RA (1990) *Catálogo de las plantas útiles de la Amazonia peruana*. Lingüístico de verano. Yarina-cocha, Iquitos, Perú.
- Samuelsson G (2004) *Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy*. Pharmaceutical Press, Stockholm.
- Sartori NT, Canepelle D, Souza PT Jr, Martins DTO (1999) Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb bark on experimental gastric lesions in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology* 67: 149-156.
- Scragg AH, Ashton S, York A, Bond P, Stepan-Sarkissian G, Grey D (1990) Growth of *Catharanthus roseus* suspensions for maximum biomass and alkaloid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology* 12: 292-8.
- Singh IP, Bharate SB, Bhutani KK (2005) Anti-HIV natural products. *Current Science* 89: 269-290
- Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 111: 187-228.
- Souza MC, Beserra AMS, Martins DC, Real VV, Do Santos NRA, Raoc VS, Da Silva RM, De Oliveira MDT (2009) *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 452-458.
- Staba EJ (1982) *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press. Florida
- Stevens PF. 1980. A revision of the Old World species of *Calophyllum* (Guttiferae). *Journal of the Arnold Arboretum*. 61: 117-171.
- Tabata M (1988) Cell culture and somatic cell genetics of plants. En: *Phytochemicals in plant cell cultures*. I.K. Vasil (Ed). Vol. 5 Academic Press, San Diego.
- Taiz L & Zeiger E (2006) *Plant physiology*. Sinauer. USA.

- Thengane SR, Bhosle SV, Deodhar SR, Pawar KD, Kulkarni DK (2006) Micropropagation on Indian laurel (*Calophyllum inophyllum*), a source of anti-HIV compounds. *Current Science* 90: 1393-1397.
- Tomas TD (2008) The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26: 618-631.
- UNAIDS (2009) AIDS epidemic update. Disponible vía [http://data.unaids.org/pub/Report/2009/2009\\_epidemic\\_update\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/Report/2009/2009_epidemic_update_en.pdf). Revisado el 02 de diciembre del 2009.
- Valverde R & Arias O (1989) Efecto morfogenético del picloram en ápices de pejíbaye (*Guilielma gasipaes*) cultivados *in vitro*. *Agronomía Costarricense* 13: 189-192.
- Vanneste S & Friml J (2009) Auxin: trigger for change in plant development. *Cell* 136: 1005-1016.
- Verpoorte R, Van der Heijden R, Hoge JHC, Ten Hoopen HJG (1994) Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. *Pure and Applied Chemistry* 66 (10/11): 2307-2310.
- Wang RR, Gub Q, Yang LM, Chen JJ, Li SY, Zheng YT (2006) Anti-HIV-1 activities of extracts from the medicinal plant *Rhus chinensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 105: 269-273.
- Whitehead IM & Threlfall DR (1992) Production of phytoalexins by plant tissue cultures. *Journal of Biotechnology* 26: 63-81.
- Wink M (1997) Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Advances in Botanical Research* 25: 141-169.
- Woradulayapinij W, Soonthornchareonnon N, Wiwat C (2005) *In vitro* HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology* 101: 84-89.

Yamada H (1991) Natural products of commercial potential as medicines. *Current Opinion in Biotechnology* 2: 203-210.

Yasunaka K, Abe A, Nagayama A, Okabe H, Lozada-Pérez L, López-Villafranco E, Estrada Muñiz E, Aguilar A, Reyes-Chilpa R (2005) Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 293-299.

Zenk MH (1978) The impact of plant tissue culture on industry and agriculture. En: *Frontiers of plant tissue culture*. TA Thorpe (Ed). Calgary, Canada. pp. 1-13.