

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE
PRODUCTES NATURALS, BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA

**Producción de saponinas triterpénicas en cultivos
in vitro de *Centella asiatica***

Susana Mangas Alonso
2009

Introducción



Introducción

1.1.- Breve historia de las plantas medicinales

En el momento en que la especie humana comenzó a explorar la naturaleza que le envolvía para satisfacer sus necesidades, lo más accesible eran los minerales y las plantas. Por este motivo, no resulta extraño que los extractos de plantas hayan sido desde el principio de los tiempos, la principal fuente de remedios contra dolencias y enfermedades, además de utilizarse como perfumes, especias, pócimas mágicas o filtros de amor, sin olvidar los venenos, que fueron usados tanto para cazar animales como para matar a los enemigos (Fig. 1).



Figura 1.- Variedad de plantas medicinales que se pueden encontrar en los mercados de Perú (A) y de China (B).

La prueba más antigua que existe sobre el uso de las plantas como medicinas fue encontrada en 1960 por Ralph Solecki, al descubrir una tumba del Paleolítico medio con varios restos fósiles de neanderthales, en la cueva de Shanidar, situada en los montes Zagros (Irak). Uno de los esqueletos, estaba acompañado por varios tipos de flores. Estudios posteriores revelaron que siete de los ocho tipos de estas flores pertenecían a especies vegetales con propiedades medicinales, como antiinflamatorias o para el tratamiento de convulsiones (Lietava, 1992).

Los orígenes de la tradición farmacológica occidental surgen de los poblados asentados en los valles del Nilo y del Eufrates. El primer documento que se conoce son unas inscripciones sumerias de unos 4000 años de antigüedad, en las cuales se describía la utilización de diferentes remedios vegetales para el tratamiento de numerosas enfermedades. Información importante la proporciona la farmacopea egipcia, en el *Papiro de Ebers* de 1550 a.C., se describen más de 700 remedios naturales, entre los que se encuentran el opio o el aloe, que

Introducción

siguen siendo utilizados actualmente (Ebbell, 1937). Paralelamente, en la India donde la medicina Ayurveda se practica desde hace más de 5000 años, los antiguos libros sagrados como el *Rig Veda*, describen hasta 2000 medicinas (Barquero, 2007). En el sistema médico oriental, el documento más antiguo es el *Pun-tsaio* escrito en el 2800 a.C. bajo el imperio del emperador Shen-Nung (Hou, 1977) (Fig. 2).

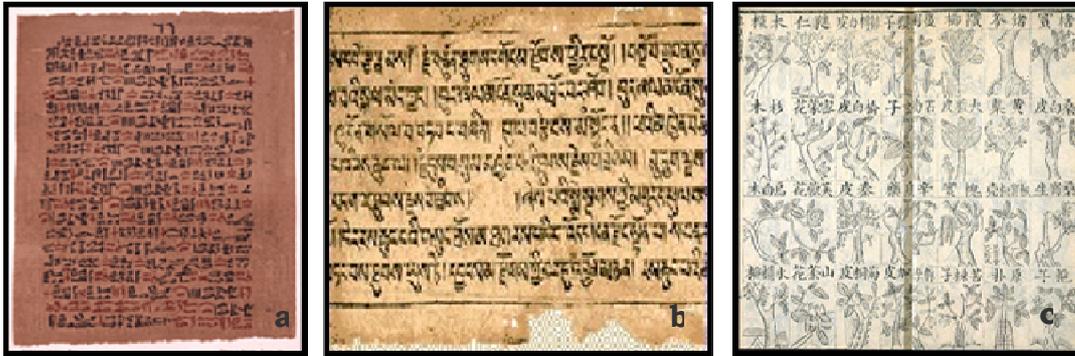


Figura 2-. Fragmentos del *Papiro de Ebers* (a), *Rig Veda* (b) y el *Pun-tsaio* (c).

En el mundo greco-romano destacan personajes importantes como Hipócrates, quien fue el primero en indicar que la enfermedad tiene una causa natural y describió diferentes tratamientos con plantas medicinales. En la Roma antigua fueron importantes los trabajos de Dioscórides (médico de los ejércitos de Nerón), del que hay que destacar *De Materia Medica*, escrito en el siglo I de nuestra era, en el cual, se describen unas 600 plantas medicinales, clasificándolas según su acción fisiológica. Galeno, medico griego (129-200 d.C.), recopiló en una veintena de volúmenes información sobre plantas medicinales y su aplicación terapéutica, dando su nombre a todo un sistema de medicina.

Entre el siglo V al XV (Edad Media), se produce el decaimiento de la cultura europea y el estudio de las plantas medicinales se restringe a los monjes cristianos. Las obras de los textos clásicos, escritas anteriormente, entran en Europa a través de las traducciones que realizan los médicos árabes y que se sumaron con el saber de la medicina árabe. Uno de los personajes más importantes de esta época fue Ibn Sina o Avicena (980-1037 d.C), médico, filósofo y científico persa, considerado como uno de los más grandes médicos de la historia (Saad y col., 2005).

A partir del siglo XV, el descubrimiento de América, permitió la utilización en Europa de drogas que durante siglos ya se estaban utilizando como remedio curativo en las civilizaciones americanas. Una representación de este conocimiento milenario se describe en el *Manuscrito Badianus*, documento que refleja la medicina tradicional de los aztecas (Fig. 3). Ejemplo de este

nuevo saber fue la exportación de la corteza del quino (árbol de la quina), utilizada por los indios de Perú para combatir la malaria; este remedio pasó a España en el s. XVI y de ahí a los diferentes países de Europa, hasta nuestra era.

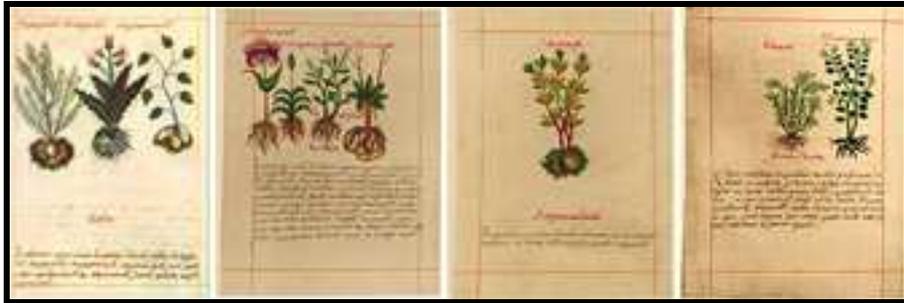


Figura 3-. Fragmento del *Manuscrito Badianus*.

En el siglo XIX, surge la idea de utilizar como fármaco un compuesto “puro” obtenido a partir de una planta con acción terapéutica. Estos estudios se iniciaron con el aislamiento de los primeros alcaloides en 1803. El farmacéutico alemán Friedrich W.A. Sertürner los descubrió intentando obtener el principio activo del opio (Balick y col., 1996).

E. Merck obtuvo la morfina a partir del opio (*Papaver somniferum* L.) y en 1831 se aisló la atropina de la planta *Atropa belladonna* L. (Chattopadhyay y Naik, 2007). De igual forma se fue avanzando en la fitoquímica de otras plantas, algunos ejemplos están descritos en la tabla siguiente:

Tabla 1-. Derivados de plantas que se utilizan en la medicina tradicional.

Fármaco	Acción
Codeína – morfina	El opio de <i>Papaver somniferum</i> era utilizado por los sumerios, egipcios y griegos contra el dolor de cabeza, artritis y como estimulante del sueño.
Atropina - hiosciamina	<i>Atropa belladonna</i> , <i>Hyascyamus niger</i> usada en Babilonia.
Efedrina	Derivada de la <i>Ephedra sinica</i> , ha sido usada en China contra enfermedades respiratorias desde el 2700 a.C
Quinina	<i>Cinchona spp</i> usada por los indios peruanos para el tratamiento de la malaria.
Emetina	Los indígenas del Brasil y otros pueblos de América del Sur usaban las raíces y los rizomas de <i>Cephaelis spp.</i> para curar la disentería y con efecto emético (vomitivo).
Colchicina	Conocido en Europa desde 78 d.C, para el tratamiento de la gota.
Digoxina	Las hojas de <i>Digitales spp.</i> han sido usada para el tratamiento de enfermedades cardíacas en Europa desde el s.XVIII.

Introducción

A lo largo de la historia se ha observado la importancia de las plantas medicinales como recurso para el tratamiento de las enfermedades que afectaban a la población. A finales del siglo pasado, aún el 80% de la población mundial utilizaban extractos de plantas medicinales como remedio de numerosas enfermedades (Silva, 1997), a veces, debido a la falta de recursos económicos para acceder al sistema de médico moderno.

De las 422.000 especies de plantas conocidas hasta la actualidad, el 12,5% se han descrito con propiedades medicinales, y en función de la biodiversidad del país puede variar este porcentaje de 4,4% al 20% (Schippmann y col., 2003).

A nivel mundial, el 25% de los medicamentos de la farmacopea moderna son derivados de plantas y otros son análogos sintéticos construidos a partir de compuestos naturales. Más del 60% de los fármacos prescritos en Europa oriental consisten en extractos de plantas naturales o ligeramente modificados, datos que en definitiva reflejan la vigencia de las plantas en la medicina actual (Rao y col., 2004). Causas como el aumento demográfico, la deforestación que se está dando principalmente en las zonas con mayor biodiversidad (desaparece un 1% de bosque cada año (FAO, 2003)), el uso de técnicas demasiado destructivas con el ambiente, la introducción de especies foráneas, hacen que muchas especies vegetales de interés farmacológico se encuentren en peligro de extinción y se necesita el desarrollo de técnicas alternativas para la producción de sus principios activos que sean respetuosas con el medio ambiente.

1.2-. Centella asiatica

Centella asiatica (L.) Urban sinónimo *C. coriacea* Nannfd anteriormente denominada *Hydrocotyle asiatica* L. o *H. lunata*, pertenece a la familia de las Umbelíferas. El nombre del genero deriva del latín *centum* = ciento, refiriéndose a las numerosas ramificaciones que puede tener la planta (Fig. 4).

Figura 4-. *Centella asiatica* en su entorno natural.



Introducción

Esta planta es empleada desde hace unos 3000 años en la India, en su sistema medicinal Ayurveda, que se basa en el conocimiento empírico de las observaciones y experiencias, desarrolladas desde 2500 a.C. hasta la actualidad. La palabra Ayurveda deriva de las palabras “ayur” que significa vida y “veda” que es conocimiento, juntas definen la filosofía de este sistema tradicional que es el “conocimiento de la vida”. En ella se describen más de 1200 enfermedades, los tratamientos para estas se basan en un 89% en la utilización de plantas superiores, un 5,2% de los remedios son minerales y un 4,8% son productos de origen marino (Biswas y Mukherjee, 2003). También ha sido utilizada por tribus africanas como tratamiento para la lepra. En Europa se vendía como purgante y vomitivo (por el sabor acre), y hasta 1884 no fue incorporada en la Farmacopea Francesa. Altas dosis provocan una acción narcótica y por ello, era utilizada por los cirujanos de la armada napoleónica (Wiat, 2006).

Es originaria de zonas subtropicales como la India, Indonesia, Pakistán, Sri Lanka, Madagascar, Europa oriental y zona meridional de Estados Unidos (Fig. 5). Generalmente vive en zonas húmedas, a orillas de lagunas y en regiones propias de climas tropicales y subtropicales, donde crece hasta los 2000 metros de altitud (Alonso, 1998).



Figura 5-. Distribución mundial de *Centella asiatica*. En rojo se indican las áreas geográficas de distribución donde se pueden encontrar esta especie.

Popularmente recibe una gran variedad de nombres, debido principalmente a la amplia distribución geográfica de la planta (Tabla 2).

Introducción

Tabla 2- Ejemplo de algunos nombres que recibe *Centella asiatica* en el mundo

Lengua	Nombre
Hindi	Brahmi
Tamil	Vallarai
Inglés	Indian pennywort
Chino	Gotu-kola
Sánscrito	Mandookaparni
Español	Centella - Hidrocotile
África	Bodila-ba-dinku

Como curiosidad existe una leyenda sobre la planta:

Cuentan que la hija del jefe de un poblado de Laos se enamoró de un leñador muy pobre. Cuando éste se presentó a pedir la mano de la muchacha, fue castigado ferozmente por el padre haciéndole un profundo corte en el vientre, ya que estaba enfurecido por la mala elección de su hija. Debido al desconsuelo en que se encontraba su hija y a las súplicas del leñador, el padre decidió darle una única oportunidad: si al cabo de un día curaba la profunda herida, podría casarse con su hija. Malherido, el muchacho se levantó y se dirigió con su último aliento hacia una zona pantanosa donde había observado que los tigres heridos se recostaban sobre unas hierbas a efectos de curar sus heridas. Imitando la actitud de los tigres el muchacho colocó esas hojas sobre su herida durante toda la noche. Al día siguiente amaneció y observó casi incrédulo que su herida estaba totalmente cicatrizada. De esta manera partió hacia la casa del jefe del poblado, le mostró su herida cerrada y éste cumplió su promesa.

De aquí que se denomine también a esta planta “hierba del tigre” ya que los tigres heridos tienen la costumbre de revolcarse en los arbustos para curarse las heridas, y describe su propiedad terapéutica principal, la acción cicatrizante.

1.2.1- Descripción botánica

Centella asiatica (L) es una planta herbácea, trepadora perenne, caracterizada por presentar largos estolones y tallos postrados de los cuales parten 1-3 tallos que pueden alcanzar hasta 15 cm de alto.

Las hojas son glabras, enteras, lobuladas o crenadas, con forma de riñón, alcanzando entre 7 y 15 cm de largo (Fig. 6).



Figura 6-. Aspecto de los largos estolones y las hojas con forman de riñón característica de *Centella asiatica*.

La inflorescencia, una umbela, presenta 3 o 6 flores rojizas sésiles y ocasionalmente blanquecinas, con unas brácteas pequeñas que rodean la flor. El fruto es un diaquenio discoide muy comprimido y sin estrías. Los mericarpos son más largos que anchos, curvados y redondeados en la punta, cubiertos por 7 o 8 capas, donde las secundarias son tan prominentes y reticulares como las primarias (Fig. 7).

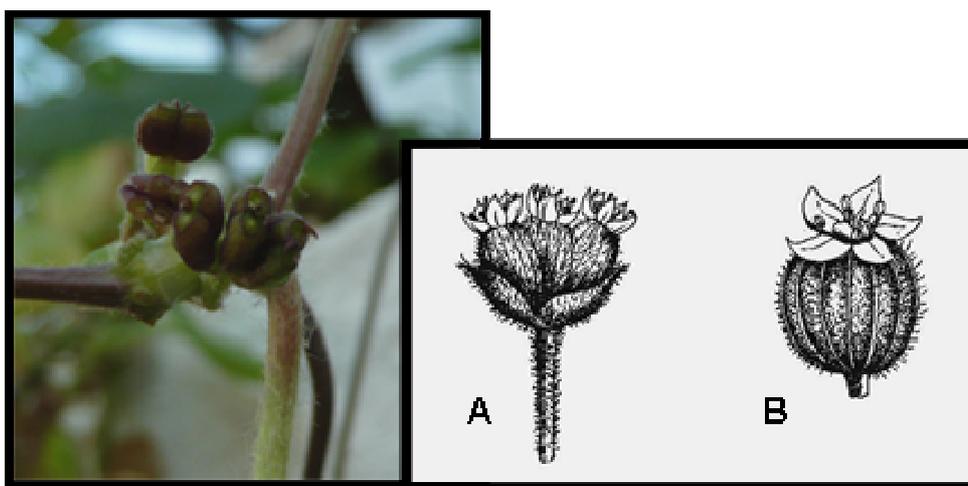


Figura 7-. Fotografía de la inflorescencia de *Centella asiatica*. En el recuadro inferior detalle de la inflorescencia (A) y de la flor (B).

Introducción

Los frutos tienen una epidermis de células poligonales, tricomas similares a los de las hojas, haces vasculares estrechos y células parenquimáticas que contienen un único y largo prisma de oxalato de calcio (Mukerji, 1953)

Características microscópicas:

Las hojas son de color verde-grisáceo, presentando en ambas caras estomas de 30 por 28 μm , principalmente de tipo rubiáceo. En el parénquima en empalizada se diferencian dos capas de células, de 45 por 25 μm . El parénquima esponjoso presenta unas tres capas de células con espacios intercelulares, algunos con cristales de oxalato cálcico. El nervio medio muestra dos o tres capas de células parenquimáticas sin cloroplastos.

La epidermis del tallo contiene una pared interior muy compacta, un colénquima de 2 o 3 capas de células, una zona amplia de parénquima, 7 haces vasculares en el interior de una zona paranquetimosa, cinco formando un filamento central y dos ramificaciones vasculares en formación. Los vasos presentan un diámetro de 15 a 23 μm . Algunas células parenquimáticas contienen cristales de oxalato cálcico (WHO, 1990).

Entre sus propiedades organolépticas, la planta de *Centella asiatica* presenta un sabor amargo o acre al paladar, color verde grisáceo y un olor característico.

1.2.2- Principios activos

Los triterpenos son los principios activos de mayor importancia farmacéutica que presenta *Centella asiatica*. Principalmente son triterpenos pentacíclicos, compuestos tipo ursano (I) u oleano (II). Dependiendo del origen de la planta, el contenido de triterpenos puede variar entre el 1-8% (Brinkhaus y col., 2000). Entre ellos se encuentran (Fig. 8):

- Madecasósido (éster del ácido madecásico (III) y una cadena trisacárida constituida por una ramnosa y dos glucosas).
- Asiaticósido (éster del ácido asiático (IV) y una cadena trisacárida constituida por una ramnosa y dos glucosas)
- Ácido madecásico y ácido asiático.
- Otras saponinas minoritarias son el centellósido, el brahmósido, brahminósido o ácido indocéntico.

Otros tipos de componentes que se pueden encontrar son aceites esenciales (β -cariofileno, α -humuleno, germaceno-D, trans- β -farnaseno y α -copaeno, entre otros), esteroides y heterósidos de flavonoides.

En la última década se han ido descubriendo nuevos compuestos de esta planta, con diferentes efectos clínicos. Shukla y col. en 2000 descubrieron un nuevo triterpeno derivado del ursano que presentaba actividad inhibitoria del crecimiento en larvas de *Spilarctia oblique* (Shukla y col., 2000). Más tarde se han descubierto nuevos triterpenos del tipo oleano-13-eno triterpenos, el centellasapogenol A y sus oligoglicósidos, y centellasaponinas B, C y D (Matsuda y col., 2001). En 2001, se separaron 5 nuevos triterpenos glucosidados de la parte aérea de *C. asiatica*, pero ninguno de ellos mostró citotoxicidad (Kuroda y col., 2001).

Poco a poco se han ido descubriendo nuevos principios activos que hacen de *Centella asiatica* una planta con un amplia aplicación terapéutica.

1.2.2.1- Saponinas

Las saponinas podrían definirse como compuestos no volátiles con actividad surfactante, formados por el metabolismo secundario de gran parte del Reino Vegetal. El nombre saponina deriva del latín *sapo* que significa jabón, pues estas moléculas presentan propiedades tensoactivas, produciendo espuma en soluciones acuosas. En general, están formadas por aglicones no polares unidos a una o más moléculas de monosacáridos. Esta combinación de estructuras polares y no polares explica la capacidad tensoactiva descrita para este tipo de compuestos (Vincken y col., 2007).

Químicamente, el término saponina define un gran grupo de moléculas de diferentes estructuras tales como esteroides y triterpenos glicosilados, los cuales presentan un precursor común: el oxido de escualeno (XI). La diferencia radica en que las saponinas esteroídicas han eliminado 3 de sus radicales metilos mientras las saponinas triterpénicas los mantienen intactos, además, algunos triterpenos no presentan el sistema policíclico característico del esterano. Dentro de este grupo, también se incluyen los alcaloides glicosteroidales, estos compuestos presentan un átomo de nitrógeno intrínseco y característico de la estructura del aglicón, lo cual implicaría separarlos del resto del grupo.

En la composición de *C. asiatica*, las saponinas, asiaticósido (0,3%) y madecasósido (1,5-2%), no son, realmente, verdaderos heterósidos, sino ésteres en el C28 de un trisacárido (α -L-Ram 1 \rightarrow 4 β D-Glu 1 \rightarrow 6 β D-Glu 1 \rightarrow) y de un ácido triterpénico derivado del ursano (I) (Fig. 8). Estos ácidos pueden ser, principalmente, el ácido asiático (ácido 2 α , 3 β , 24 α -trihidroxi-urs-

Introducción

12(13)-en-28-oico) (III) y el ácido madecásico (ácido 6 β -hidroxiasiótico o ácido 2 α , 3 β , 6 β , 24 α -tetrahidroxi-urs-12(13)-en-28-oico) (IV).

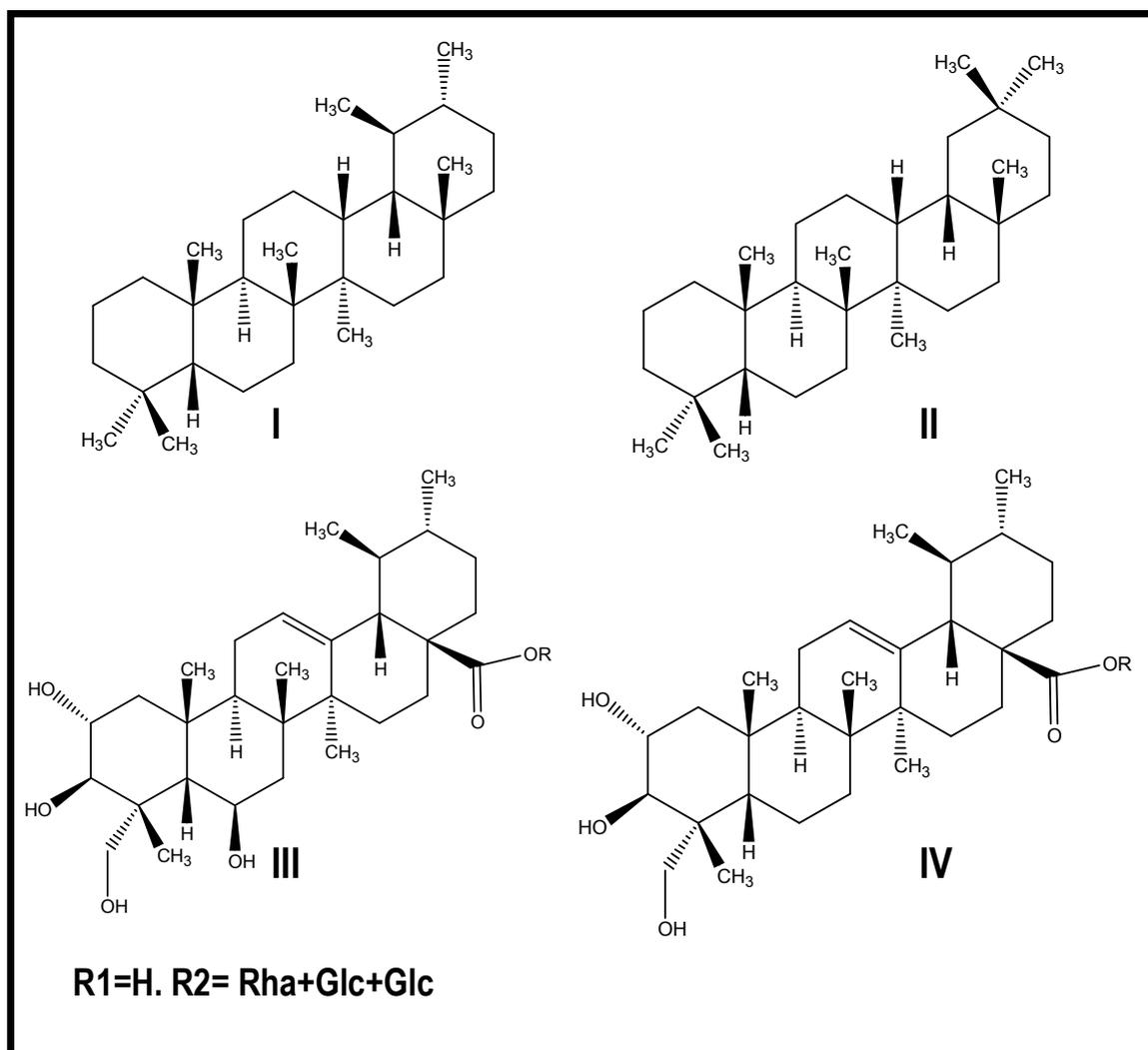


Figura 8-. Estructura química del ursano (I), oleano (II), ácido madecásico (III+R1), madecasósido (III+R2), ácido asiático (IV+R1) y asiaticósido (IV+R2).

El contenido de saponinas en planta depende de diversos factores desde el tipo de cultivar, la edad, el estado fisiológico, la localización geográfica o el órgano vegetal. Así se pueden encontrar ejemplos como el *Panax ginseng* donde su producción se da en la parte subterránea, mientras que en *Centella asiatica*, se producen y/o acumulan principalmente en la parte aérea concretamente en hojas (Kim y col., 2004a).

Las saponinas en el organismo vegetal presentan una amplia gama de propiedades, las cuales incluyen desde emulsionantes, insecticida, acción alelopática o como fitoprotectores contra ataque de microorganismos y herbívoros (Osbourn, 1996). Las raíces de *Dolichos kilimandscharicus* presentan actividad fúngica atribuida al 3-O-glucósidos de hederagenina y al

ácido medicagénico, los cuales inhiben el crecimiento de diferentes patógenos como *Cladosporium cucumerinum* (Hostettmann y Marston, 1995). Otro caso de defensa contra hongos son las saponinas sintetizadas en la raíz de alfalfa como el ácido medicagénico 3-O-β-D-glucopiranosil-glucopiranosido. Las saponinas de *Primula acaulis* también presentan actividad fúngica contra diferentes cepas de *Candida*. Otro ejemplo de la actividad de las saponinas en planta, es su acción contra las termitas, como ocurre en *Ternstroemia japonica* o *Kalopanax septemlobus*. Mientras que para el ser humano presentan importantes propiedades farmacéuticas y cosméticas (Uematsu y col., 2000).

1.2.2.2- Biosíntesis de la formación de saponinas triterpénicas

Las saponinas triterpénicas presentan una estructura policíclica, normalmente tetra o pentacíclica. Como ya se ha comentado en la sección anterior, en *Centella asiatica* son básicamente pentacíclicas y poseen un grupo hidróxilo en el C3, además de diferentes modificaciones del esqueleto básico del ursano (I) (Haralampidis y col., 2002).

La biosíntesis de las saponinas discurre por la vía isoprenoide, en la que 3 unidades isoprenoides (moléculas de 5C) se unen cabeza-cola [1'-5] resultando un compuesto de 15C, el farnesil difosfato [FPP] (X). En general se admite que la formación del FPP se produce por condensación de una molécula de dimetilalil difosfato [DMAPP] (IX) con 2 de isopentenil difosfato [IPP] (VIII), sintetizados a partir de la ruta citoplasmática de formación de terpenos que tiene como intermediario clave el mevalonato (Fig. 9).

La unión de dos moléculas de farnesil difosfato, dará lugar al escualeno (compuesto lineal de 30 carbonos, aislado inicialmente del hígado del tiburón, *Squalus spp.* y dando nombre al compuesto) (Gil, 2002). La enzima formadora de escualeno, la escualeno sintasa, se localiza en plantas a nivel del retículo endoplasmático (Stamellos y col., 1993). Esta enzima cataliza uno de los principales puntos de ramificación de la vía de terpenos canalizando el flujo de carbono hacia a la formación de triterpenos, por ello puede estar sometida a un estricto control metabólico. De esta forma se ha visto, por ejemplo que la elicitación de cultivos celulares de tabaco, provoca una disminución de los niveles de esteroides asociada a una reducción de la actividad escualeno sintasa (Devarenne y col., 2002).

Introducción

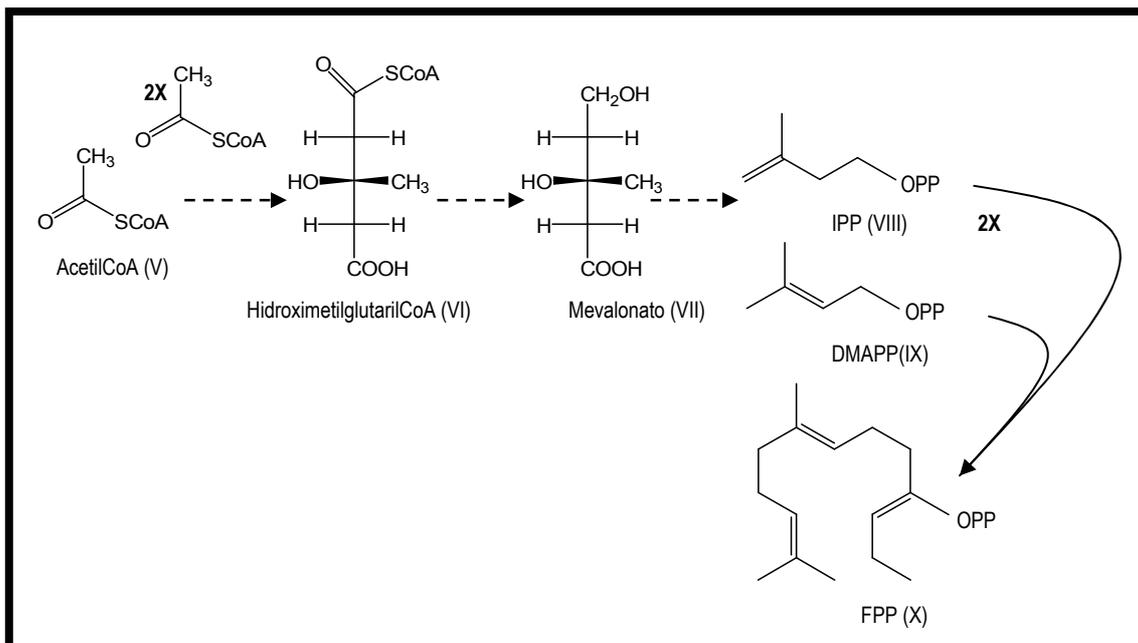


Figura 9-. Formación citoplasmática del farnesil difosfato (FPP) a partir de acetil-CoA. IPP: Isopentenil difosfato, DMAPP: dimetilalil difosfato.

La molécula del escualeno es oxidada para dar el 2,3-oxidoescualeno (XI), a partir del cual se inicia la biosíntesis de las saponinas triterpenoides (Fig. 10). Para la síntesis de estos compuestos, se necesita la ciclación del 2,3-oxido de escualeno, que permitirá la formación de una gran variedad de productos. Existen numerosas escualeno ciclasas que dan lugar a la formación de un gran grupo de triterpenos con los sistemas policíclicos del oleanano o el dammarano, entre otros. La ciclación del escualeno también dará lugar a la formación esteroides, vía lanosterol, en hongos y animales, o vía cicloartenol (XIII) en las plantas superiores (Hostettmann y Marston, 1995).

La ciclación se inicia por la ruptura del anillo de oxirano, catalizada en un medio ácido, y ha sido demostrado con la utilización de ¹⁸O, que el escualeno forma un epóxido con el oxígeno del aire. La apertura del oxirano ocasiona la ciclación de la molécula, dando lugar a dos posibles compuestos, dependiendo de la pre-conformación del 2,3-epóxido escualeno.

Las dos conformaciones son "silla-bote-silla" que dará lugar el catión protosterilo, precursor de los esteroides; y la conformación "silla-silla-silla", que dará lugar al catión dammaranilo, que puede o no sufrir ciclaciones complementarias (Fig. 10). Este último compuesto es el precursor de los triterpenos pentacíclicos (Haralampidis y col., 2002).

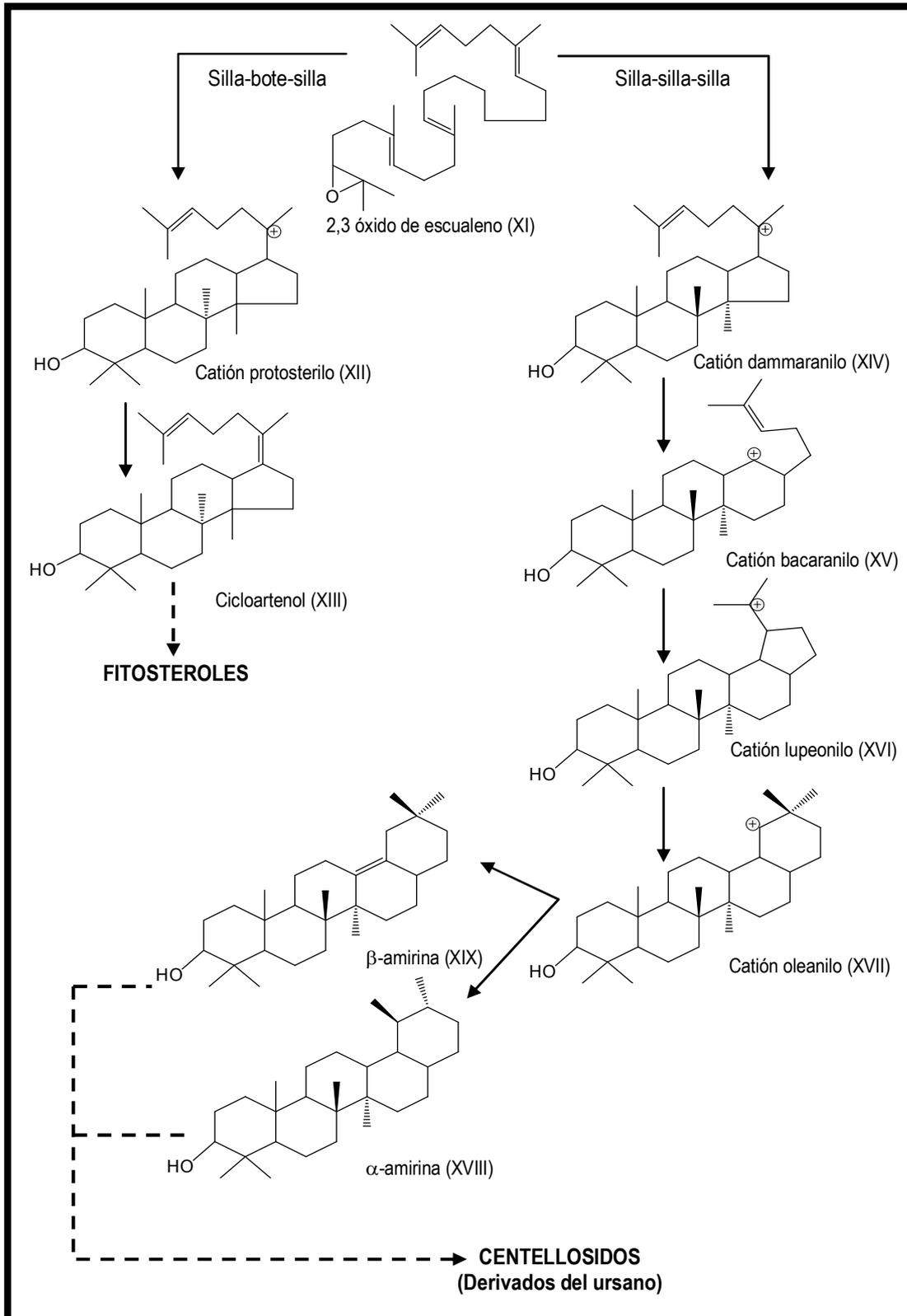


Figura 10-. Esquema de los principales pasos conocidos de la biosíntesis de las saponinas triterpénicas de *C. asiatica*.

Introducción

A partir del catión dammaranilo (XIV), a través de diferentes conversiones, se pasa por los cationes bacaranilo (XV), lupeonilo (XVI) y oleanilo (XVII). Sobre este último, actúa la enzima α -amirina sintasa o la β -amirina sintasa, que darán lugar respectivamente a α -amirina (XVIII) o a la β -amirina (XIX) (se duda de cual es el precursor potencial de los ácidos asiático (III) y madecásico (IV) aunque la similitud estructural parece sugerir que sería la α -amirina).

Finalmente, mediante diferentes oxidaciones que no se conocen del todo, se llega a los dos principios activos más importantes de la *C. asiatica*, el ácido asiático (IV) y el ácido madecásico (III) que tras la esterificación con el trisacárido [Rha+Glc+Glc] generan las respectivas estructuras de los heterósidos: asiaticósido y madecasósido (Fig. 10).

Como se ha comentado, la ruta de biosíntesis de las saponinas triterpénicas presenta un precursor común con la ruta de formación de los esteroides, el escualeno. La presencia de un precursor común, genera una competencia entre ambas vías y por ello resulta interesante el estudio conjunto de ambas, aunque clásicamente, se haya considerado la formación de fitoesteroides como una ruta primaria y universal en las plantas, mientras que la formación de saponinas se considera una ruta típicamente secundaria y restringida a nivel taxonómico (Sakurai y Fujioaka, 1997; Schumacher y Chory, 2000).

La mayor parte de los fitoesteroides presentes en plantas superiores, son componentes primarios de las membranas celulares, en forma de esteroides libres. Su función principal es la de regular la fluidez y la permeabilidad de éstas, una composición apropiada de esteroides es crucial para una óptima actividad enzimática, un correcto transporte de metabolitos e iones o una buena transducción de señal (Schaller, 2003).

Entre los fitoesteroides componentes de membranas están el sitosterol y el campesterol, éste último, precursor de unos derivados polihidroxilados, llamados brasinosteroides, que son considerados actualmente reguladores del crecimiento. Este grupo de reguladores intervienen en procesos de elongación celular (Azpiroz y col., 1998). En plantas mutantes se ha comprobado que la falta de estos compuestos genera una disminución de la fertilidad debido a la falta de elongación del estambre.

Los principales productos finales de la biosíntesis de esteroides en plantas superiores son el campesterol (XX) y sitosterol (XXI) (estos dos sintetizados en el retículo endoplasmático). Las proporciones de colesterol (XXII), campesterol, sitosterol y estigmasterol (XXIII) son determinadas por la actividad de esteroil metiltransferasas, que catalizan la transferencia de dos carbonos de la S-adenosil metionina a la posición C24 de los esteroides (Fig.11). Existen dos clases de esteroil metiltransferasas SMT1 y SMT2. La SMT1 cataliza la metilación del

Introducción

cicloartenol (XIII) y en pasos posteriores, la obtención de colesterol, mientras que la SMT2 es responsable de la metilación de 24-metilenlofenol y permite separar la vía de formación del sitosterol de la del campesterol (Fig. 12).

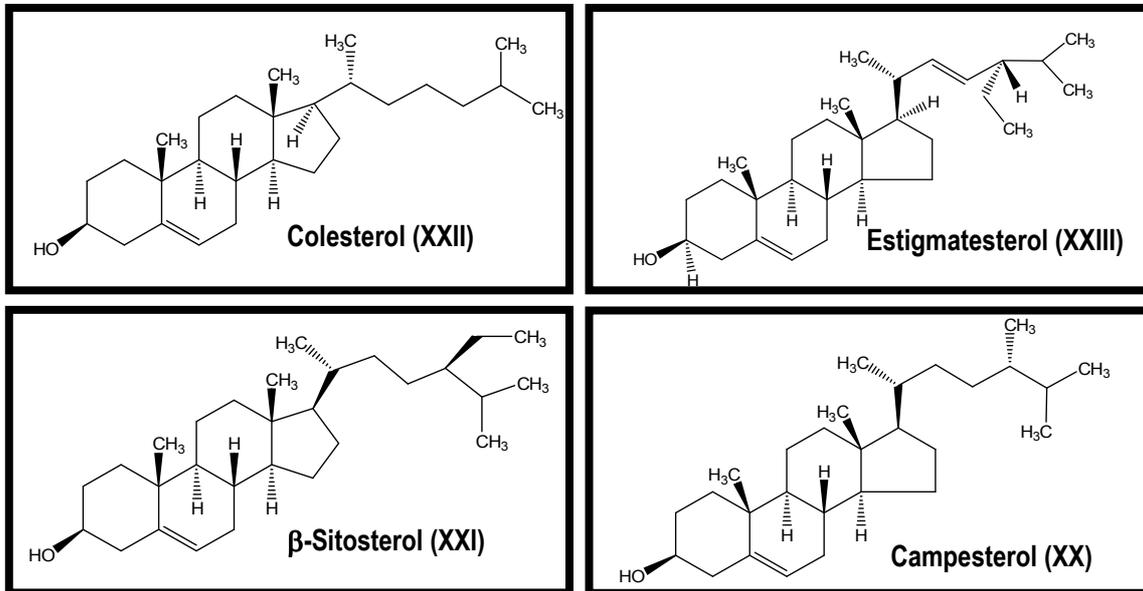


Figura 11-. Estructura de los principales esteroides analizados (colesterol, estigmasterol, campesterol y sitosterol).

Por otro lado, también existen una menor proporción de esteroides unidos a ácidos grasos (Dyas y Goad, 1994) cuya función estaría relacionada con la estructura de la cubierta externa del polen (Wolters-Arts y col., 1998; Murphy, 2001), y actuarían como un componente adhesivo facilitando así la polinización mediante insectos.

Otra clase esteroides son los glucósidos esteroídicos y los glucósidos acilesteroidicos, sintetizados y localizados en la membrana plasmática. Se han descrito como compuestos relacionados con la adaptabilidad a bajas temperaturas (Palta y col., 1993). Libres o conjugados, los esteroides están distribuidos en la mayoría de tipos celulares, la regulación de los contenidos de estas dos formas se desconoce pero se sugiere que estaría relacionada con las concentraciones de esteroides libres, presentes en la membrana plasmática (Ullmann y col., 1993) (Fig. 12).

Introducción

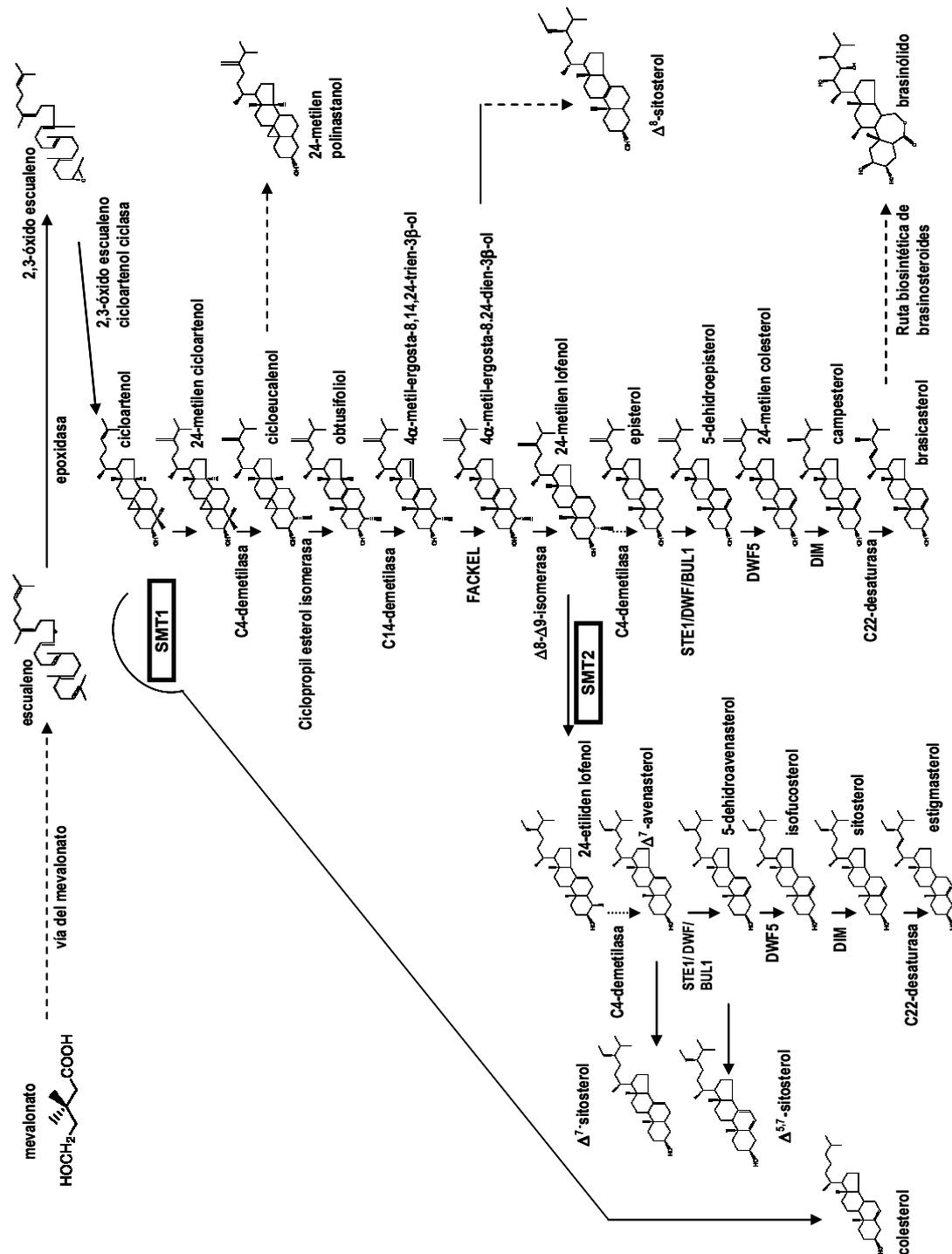


Figura 12-. Biosíntesis de esteroides en plantas superiores. SMT1 (cicloartenol-C24-metiltransferasa); SMT2 (24-metilen lofenol-C241-metiltransferasa); FACKEL (esterol-C14-reductasa); STE1/DWF7/BUL1 (Δ^7 -esterol-C5(6)-desaturasa); DWF5 ($\Delta^5,7$ -esterol- Δ^7 -reductasa); DIM ($\Delta^{24(25)}$ -esterol reductasa), modificado de H.Schaller (2003) Progress in Lipid Research 42 :163-175.

Introducción

Actualmente, a nivel molecular, se conoce muy poco sobre la biosíntesis de centelósidos. Los pocos genes secuenciados codifican para enzimas que catalizan reacciones que van desde la formación del escualeno a enzimas ya específicas de la ruta de los fitoesteroles y de las saponinas triterpénicas (Fig. 13).

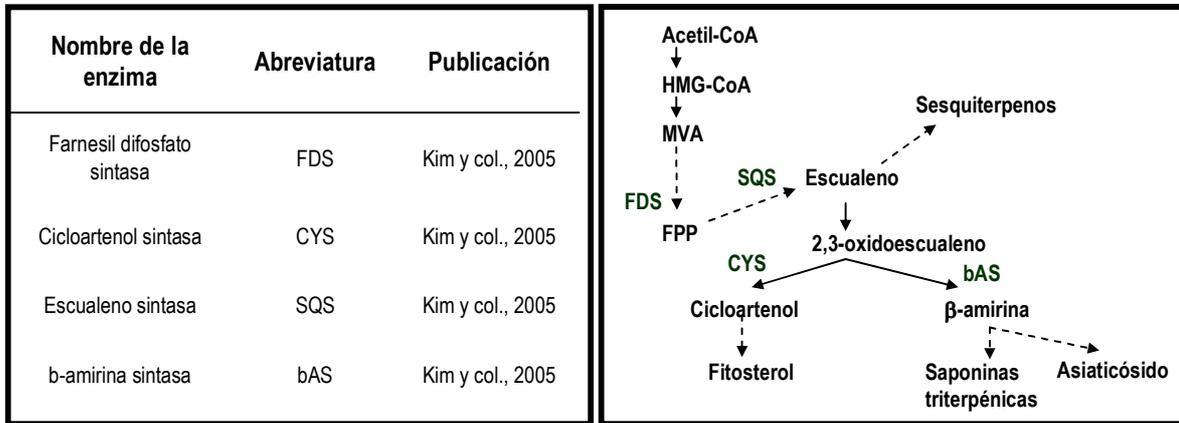


Figura 13-. Enzimas secuenciadas de *C. asiatica* de la ruta biosintética de triterpenos.

La primera enzima común de ambas vías, la farnesil difosfato sintasa (FDS) cataliza la formación del FPP, que es el precursor de escualeno y los sesquiterpenos (Kim y col., 2005a). La siguiente enzima secuenciada de la vía metabólica es la escualeno sintasa (SQS) (Kim y col., 2005d), encargada de la formación del escualeno catalizando la unión [1'-1] de dos moléculas de FPP. La epoxidación de esta molécula permite la formación del 2,3-oxidoescualeno y en función de la ciclase que actúe sobre esta molécula se formarán los fitoesteroles o las saponinas triterpénicas. En pasos posteriores, ya exclusivos de la vía de las saponinas o de los fitoesteroles, se han secuenciado los genes de dos ciclasas: β -amirina sintasa (bAS), enzima específica para la formación de la β -amirina, un potencial precursor de los centelósidos (Kim y col., 2005b) y la cicloartenol sintasa (CYS) enzima clave para la formación de fitoesteroles (Kim y col., 2005c). Estos genes se secuenciaron mediante la utilización de primers degenerados, aprovechando la alta homología que presentan en diferentes especies vegetales, como *Panax ginseng* (89% para la CYS) o *Arabidopsis thaliana* (72% para FDS). Mediante técnicas de análisis de DNA, como el Southern blot, se ha podido conocer el número de copias de estos genes que se encuentran en el genoma vegetal, sugiriendo en la mayoría de casos, la presencia de una sólo copia del gen.

El interés por las respectivas enzimas se debe a que pueden controlar la producción de metabolitos secundarios en respuesta diferentes factores, como es la elicitación mediante jasmonato de metilo. Se ha demostrado que la adición del elicitor provoca un aumento en la producción de los principios activos que va acompañado por un incremento en la expresión de

Introducción

SQS y bAS por el contrario, hay una disminución de la expresión de CYS. Efectos que se han demostrado tanto en *Centella asiatica* como en otras plantas también productoras de saponinas triterpénicas, como en *Panax notoginseng* (Hu y Zhong, 2008).

1.2.3-. Interés farmacológico de *C. asiatica*

La *Centella asiatica* ha sido utilizada clásicamente en la medicina tradicional Ayurveda para el tratamiento de enfermedades de la piel y trastornos de tipo nervioso como la histeria o la epilepsia (Skopinska-Rozewska y col., 2002). De igual manera también ha sido usada como antipirético, analgésico, antiinflamatorio y en casos de insuficiencia venosa (Matsuda y col., 2001). Otros usos descritos para *C. asiatica*, pero que no han estado corroborados por datos experimentales o clínicos, son la terapia del albinismo, anemia, asma, bronquitis, cólera, disentería, hepatitis, sífilis y uretritis.

En el mundo occidental, *C. asiatica* fue utilizada por primera vez en Francia en 1880. Los médicos británicos la utilizaron en África para el tratamiento de la lepra.

El asiaticósido fue aislado y purificado en 1940 y los primeros estudios clínicos sistemáticos se iniciaron en 1945. La mayoría de estudios clínicos sobre *C. asiatica* han sido realizados con extractos alcohólicos o acuosos de: TECA {planta seca de *C. asiatica*}, TTFCA {fracción triterpénica total de *C. asiatica*} combinaciones de ácido asiático (30%), madecásico (30%), y asiaticósido (40%), o TTF {fracción triterpénica total} compuesta por los ácidos asiático y madecásico (60%) en una relación que aún no está claramente definida, en combinación con asiaticósido (40%).

En la década de los setenta, investigadores italianos y del resto de Europa encontraron evidencias de que esta planta puede mejorar significativamente los síntomas de las úlceras leprosas y tuberculosas, cutáneas. Esta utilización llevó a diferentes grupos científicos a la investigación de los extractos de asiaticósido, enfocadas principalmente a estas enfermedades, así se pudo comprobar, que inyecciones subcutáneas de extractos de asiaticósido presentaban resultado satisfactorios, para tratar lesiones provocadas por la lepra (Boiteau y Ratsimamanga, 1956).

1.2.3.1-. Acción cicatrizante

Una capacidad característica de *C. asiatica* es su acción cicatrizante de heridas o para su aplicación en diversas enfermedades de la piel. La cicatrización consiste en un complejo proceso fisiológico que requiere diferentes pasos, dentro de los cuales están la granulación, maduración del colágeno y finalmente la cicatrización. Se ha confirmado en pruebas con ratones y

comprobadas en ensayos paralelos realizados en personas, que extractos de la planta intervienen en diferentes etapas del proceso de cicatrización (Suguna y col., 1996; Shetty y col., 2006).

El extracto de *C. asiatica* se usa como coadyuvante en el tratamiento de heridas quirúrgicas y quemaduras leves (segundo y tercer grado) de poca extensión y como complemento también, en cicatrices e hipertrofias. Por vía oral, la *C. asiatica* se usa en problemas de falta de cicatrización o por su exceso, que lleva a la formación de queloides (Morisset R y col., 1987).

Los triterpenos aislados de la planta, estimulan la formación de la matriz extracelular y hay evidencias *in vitro* de la variación de la expresión de genes en fibroblastos de la dermis de humanos (Coldren y col., 2003). El asiaticósido estimula la activación fibroblástica al activar la síntesis *in vitro* de colágeno I (Lu y col., 2004), mientras que el madecasósido estimula la secreción de colágeno III. La estimulación de la síntesis del colágeno se realiza por activación del receptor TGF- β , mediante la ruta de las Smad independiente de quinasas (Lee y col., 2006).

El asiaticósido aumenta la fuerza tensil de la piel, nuevamente formada, promoviendo la curación de heridas. También inhibe el proceso inflamatorio que podría provocar la hipertrofia de cicatrices y mejora la permeabilidad capilar.

Según la OMS y diversos estudios clínicos, los preparados de *C. asiatica* están indicados por vía tópica como cicatrizantes, en especial para acelerar la curación de heridas postraumáticas o posquirúrgicas, así como de quemaduras y la prevención de estrías gravídicas. También en el tratamiento de la soriasis, lesiones cutáneas provocadas por el herpes simple y para aliviar los síntomas de enfermedades del tejido conectivo, como la esclerodermia (Suguna y col., 1996).

1.2.3.2- Acción antiulcerante

Diversos estudios han demostrado la acción antiulcerante de los extractos de *C. asiatica*. Cheng y colaboradores (2004), confirmaron estos efectos en ratas, a las cuales se les había inducido úlceras gástricas, mediante ácido acético y habían sido tratadas con extractos de planta posteriormente. En estos experimentos se observó que, de manera significativa disminuía la actividad mieloperoxidasa (el incremento de la actividad está asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo característico de determinadas patologías), por el contrario, se favorecía la proliferación de células epiteliales y la angiogénesis, a parte de observar un aumento en la expresión de factores de crecimiento de fibroblastos en tejidos ulcerosos (Cheng y col.,

Introducción

2004). Los extractos de *Centella asiatica*, se pueden emplear oralmente para el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales, producidas por estrés (Cheng y Koo, 2000). También pueden servir contra úlceras provocadas por factores físicos o químicos, como etanol o el ácido acetilsalicílico (Sairam y col., 2001).

Por otro lado, también se ha observado que los extractos de *C. asiatica* presentan una actividad antiinflamatoria debido a una inhibición de la síntesis de óxido nítrico en las úlceras (Guo y col., 2004)

Los resultados más favorecedores se obtuvieron en el tratamiento de trastornos tróficos de tipo ulcerativo, en que el extracto de *C. asiatica* provocaba una rápida cicatrización y epitelización, después de efectuar un tratamiento de diatermocoagulación (coagulación de los vasos mediante calor) (Chowdhury y col., 1987).

En 1964, Torre y colaboradores, demostraron los beneficios de administrar tanto local como vía intramuscular extractos de *C. asiatica*, en casos de desgarros perineales como consecuencia de manipulaciones obstetricias. El seguimiento observado a los 60 días del tratamiento reveló una muy buena cicatrización. Por esta misma vía de administración, también fue efectivo el tratamiento, en el caso de úlceras duodenales (Alonso, 1998).

Debido a la particular situación observada, en el tejido de colágeno en casos de celulitis, Hachem y Burgain, a mediados de la década de los 70, se propusieron investigar anatomopatológicamente lo que ocurre en este tipo de lipodistrofia localizada. Por este motivo, realizaron una prueba de doble ciego común con extracto purificado de *C. asiatica* mediante estudios comparativos de muestras de biopsias de etmoides y trocánter tomados antes y después del tratamiento, durante tres meses (Hachem y Borgoin, 1979). Los exámenes histológicos revelaron una reducción en la tendencia a la esclerosis por parte de los fibroblastos en los focos celulíticos, respecto a los grupos control. El ácido madecásico fue identificado como el principal componente antiinflamatorio, mientras que el asiaticósido era el principal cicatrizante (Tsurumi K. y col., 1973).

Los triterpenos de *C. asiatica* han demostrado ser muy eficaces contra los casos de celulitis leves, de acuerdo con varias experiencias directas en humanos.

1.2.3.3-. Patologías vasculares

Hasta el momento, se han realizado investigaciones clínicas sobre el uso de *C. asiatica* en el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica y de venas varicosas. En un estudio de doble ciego con un placebo controlado, utilizando extractos de *C. asiatica* (TECA) se demostró que el grupo que recibió TECA presentaba una mejora significativa en síntomas tales como pesadez de

los miembros inferiores y edema (Pointel y col., 1987). La distensibilidad venosa, medida por pletismografía (examen que mide la presión sistólica de la sangre de la pierna comparada con el brazo, que generalmente se lleva a cabo para descartar bloqueos en las extremidades) mejoró en los grupos que recibieron TECA, pero empeoró en el grupo placebo. Las diferencias en los efectos de las distintas dosis de TECA no fueron significativas, aunque revelaron una relación dosis-dependiente (Maquart y col., 1990).

En otro experimento, se administró un extracto TTFCA a 20 pacientes con venas varicosas severas en las piernas, durante un período de tres meses. Previo al tratamiento, se determinaron los niveles basales de enzimas lisosómicas (β -glucuronidasa $1,8 \pm 0,4 \mu\text{M}/\text{min}/\text{l}$, β -N-acetilglucosaminidasa $23,1 \pm 0,4 \mu\text{M}/\text{min}/\text{l}$, y arisulfatasa $0,078 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{min}/\text{l}$), niveles que se consideraron elevados, indicando un recambio metabólico de mucopolisacáridos, aumentado en pacientes con venas varicosas. Durante el tratamiento, los niveles disminuyeron progresivamente y al finalizar el estudio se determinó la disminución de las tres enzimas lisosómicas (β -glucuronidasa $1,2 \pm 0,05 \mu\text{M}/\text{min}/\text{l}$, β -N-acetilglucosaminidasa $17,7 \pm 0,7 \mu\text{M}/\text{min}/\text{l}$, arisulfatasa $0,042 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{min}/\text{l}$). Esta reducción fue interpretada como la evidencia de un efecto positivo de los extractos TTFCA en la patogénesis de las venas varicosas (Arpaia y col., 1990).

En un estudio doble ciego con placebo controlado, sobre los efectos de extractos de *C. asiatica* en la tasa de filtración capilar, se administró extracto TTFCA a 62 pacientes y a dos dosis diferentes. La tasa de filtración capilar, fue evaluada en comparación con el placebo. Al finalizar el periodo de cuatro semanas de tratamiento, se observó una reducción dosis-dependiente en la tasa de filtración capilar medida por pletismografía. En comparación con el grupo placebo, la mejoría observada en el grupo tratado fue significativa. La reducción de la tasa de filtración capilar se relacionó con una mejora en la microcirculación (Cesarone y col., 1992; Cesarone y col., 1994) y en los síntomas clínicos. Además, la aplicación local de extractos TTFCA ha demostrado mejorar el tono vascular. En un estudio doble ciego con 80 pacientes, el extracto de *C. asiatica* aplicado localmente tres veces por día, a pacientes con varias alteraciones venosas (incluyendo varices y hemorroides) produjo mejorías subjetivas y objetivas de los síntomas de estos pacientes (MacKay, 2001).

En su conjunto los estudios clínicos realizados con extractos de *C. asiatica* indican su aplicación en la insuficiencia venosa crónica, venas varicosas, hipertensión venosa, así como, en la prevención de problemas circulatorios producidos por vuelos de media y larga distancia. Otros estudios recientes confirman su utilidad en la microangiopatía diabética, y algunos ensayos

Introducción

clínicos sugieren una acción contra las estrías y la celulitis, debido a su acción diurética y en la mejora de la circulación linfática.

En diferentes pruebas a doble ciego versus placebo, se ensayaron extractos purificados de *C. asiatica* en pacientes con insuficiencia venosa crónica (Alonso, 1998). El resultado final, determinó la efectividad del tratamiento en prácticamente todos los pacientes, salvo los que presentaban síntomas de trofismo cutáneo y parestesias (sensación de hormigueo y de adormecimiento de los brazos y las piernas).

En el caso de úlceras tróficas venosas de miembros inferiores, varios autores han señalado la utilidad general de los extractos purificados de *C. asiatica*, administrados tanto local como parenteralmente. En ratas, el extracto de *C. asiatica* inhibe de manera significativa la ulcerogénesis inducida por el frío y por el estrés (Chatterjee y col., 1992; Sairam y col., 2001), pudiéndose observar en casi todos los casos una mejoría en las reacciones eczematoides que generalmente acompañan la lesión, una mejoría en la estasis venosa crónica (estancamiento de sangre en las venas) y una intensa formación del tejido de granulación acompañada de una epitelización más rápida que la provocada por tratamientos convencionales (Alonso, 1998).

Se han probado los efectos de los extractos acuosos y alcohólicos de *C. asiatica* sobre la musculatura lisa de cobayas, observándose un efecto antiespasmódico, atribuido al asiaticósido principalmente (Chowdhury y col., 1987). También se ensayó el mismo tipo de extractos en ratas, provocando un descenso en la actividad motora espontánea, dilatando o disminuyendo la acción convulsiva de pentilentetrazol, a la vez que se potenciaba la acción inductora de sueño provocada por pentobarbital. Esta actividad fue comparada con la que produce el diazepam en igual situación (Diwan, V y col., 1991).

1.2.3.4-. Acción sobre el Sistema Nervioso

En la medicina tradicional China e India se han descrito desde la antigüedad diversos efectos de *C. asiatica* sobre el Sistema Nervioso Central, como tónico estimulante, rejuvenecedor, sedante, tranquilizante, mejora de la memoria y del intelecto. En los últimos años, algunas de estas actividades han sido demostradas experimentalmente.

Se ha comprobado que los extractos de *C. asiatica* aumentan la capacidad cognitiva y potencian mecanismos antioxidantes (Veerendra y Gupta, 2002). Del mismo modo, se ha demostrado un aumento en el rendimiento del aprendizaje espacial y de la memoria en ratas neonatales durante el crecimiento, como un aumento en la arborización dentríconeuronal CA3 del hipocampo. En definitiva, estos resultados muestran que los extractos de *C. asiatica* actúan

en regiones del cerebro que están implicadas en el aprendizaje y la memoria (Rao y col., 2005; Mohandas Rao y col., 2006).

Esta planta también ha sido utilizada en el tratamiento del síndrome de déficit de atención y en casos de retraso mental, aunque aún no se conoce el mecanismo de acción, en estas patologías. En un estudio desarrollado en la India, se administraron durante doce semanas a niños con retraso mental, tabletas con extractos de hoja de *C. asiatica*, observando un aumento de la capacidad intelectual, respecto a un grupo control, al finalizar el tratamiento (Alonso, 1998).

Estudios *in vivo*, realizados en ratas, demostraron un efecto depresor sobre el sistema nervioso central del ácido bráhmico y del brahmósido cuando fueron administrados intraperitonealmente. Estos mismos compuestos producen hipertensión arterial pero sólo cuando se administran en dosis alta (Ramaswamy, 1970). Estos efectos se producen a través de la regulación en la secreción de neurotransmisores (noradrelanina, dopamina y serotonina), provocando un descenso de los mismos. Se cree que la mayor capacidad de memoria mostrada por los animales está vinculada especialmente con una disminución de la serotonina (Foster, 1996).

Este hecho está, asociado a la acción depresora sobre el sistema nervioso de *C. asiatica*, incrementando la concentración de ácido γ -aminobutírico (GABA) en el cerebro (Chatterjee y col., 1992). El aumento de los niveles cerebrales de GABA, explica su uso tradicional como ansiolítico y anticonvulsivo (Cauffield y Forbes, 1999; Bradwejn y col., 2000).

Recientemente, se han demostrado las propiedades antioxidantes de *C. asiatica* en ratas. El estrés oxidativo o un mecanismo antioxidante endógeno deteriorado son factores que están implicados en el Alzheimer y la pérdida de memoria en personas mayores, lo que podría explicar su aplicación contra esta enfermedad (Kumar y Gupta, 2003).

1.2.3.5.-Acción antitumoral

Los extractos de *Centella asiatica* tienen propiedades inmunoestimulantes, produciendo citólisis inmunológica, lo que podría explicar los beneficios observados en pacientes con cáncer.

En un estudio desarrollado en el Amala Cancer Research Center en India se pudo comprobar que extractos metanólicos de *C. asiatica* mostraban un 100% de inhibición en cultivos *in vitro* de células sarcomatosas. Posteriores estudios sobre ratas con diferentes tipos de tumores, mostraron una mayor supervivencia (cercana al doble) en aquellos animales tratados con dichos extractos. En ningún caso se observó toxicidad, incluso en dosis mayores a las utilizados en el tratamiento de heridas (Babu y col., 1995).

Introducción

Se han realizado estudios, en los cuales se ha probado el asiaticósido combinado con vincristina (fármaco que inhibe la polimerización de la tubulina) en líneas cancerosas, demostrando que el asiaticósido actúa como un modulador que induce la apoptosis (Huang y col., 2004). También, se ha probado en cáncer colón con efectos positivos, inhibiendo el crecimiento del tumor (Bunpo y col., 2004). Por otro lado, se ha sugerido que el ácido asiático podría ser un candidato como factor terapéutico en el tratamiento del cáncer de piel (Park y col., 2005).

1.2.3.6-. Otros efectos

Otras acciones farmacológicas de los extractos de *C. asiatica* observadas en animales de experimentación son: actividad antiulcerosa, antivírica, inmunomoduladora, antimicótica y antipirética (Brinkhaus y col., 2000).

También es usada en alimentación en Bangladesh, Tailandia y Sri Lanka, donde se comercializan hojas de *C. asiatica* como alimento, debido a su riqueza en proteínas, carotenos y vitamina C (Leung y Foster, 1998).

Otro campo en el cual la *C. asiatica* presenta una gran demanda es en el campo de la cosmética, este mercado (esencias, cuidado de la piel, maquillaje, etc.) movió unos 124\$ billones en el año 2001 (Kumar, 2005). El interés por el cuidado personal y la búsqueda para conseguir la eterna juventud no es actual, los antiguos hombres se pintaban sus caras de rojo, marrón o amarillo, con arcilla, lodo o arsénico. El maquillaje, los tatuajes o adornos representaban un estatus social. Los romanos usaban aceites corporales, en sus baños o fuentes. Sin olvidar la obtención de perfumes naturales a partir de una gran variedad de aromas.

Uno de los ámbitos de la cosmética en los que se usa *C. asiatica* es en el rejuvenecimiento de la piel. El envejecimiento de la piel es el resultado de un continuo proceso de deterioro en el cual está implicado un daño celular del DNA y otros compuestos. Entre ellos está la desestructuración del colágeno de la matriz celular, disminuyendo la elasticidad de la piel y un mal funcionamiento de los queratinocitos. *C. asiatica* estimula la síntesis de colágeno I (compuesto principal en las matrices celulares), a la par que es antioxidante, propiedades que permite un mayor cuidado de la piel y que se refleja por un rejuvenecimiento de esta (Ahshawat y col., 2008).

C. asiatica también se usa en el tratamiento de la celulitis. La celulitis es una alteración de la topografía de la piel que ocurre principalmente en mujeres, apareciendo en caderas y abdomen y popularmente recibe el nombre de "piel de naranja" (Rossi y Vergnanini, 2000).

Principalmente es un problema antiestético, aunque lo presenta casi el 90% de las mujeres. En esta alteración esta implicada la matriz extracelular, el sistema microcirculatorio y linfático, en que existe un exceso subcutáneo de grasa que repercute en el aspecto de la piel (Rawlings, 2006). Se ha comprobado que el tratamiento con *C. asiatica* favorece la reducción del diámetro de los adipocitos especialmente en la región glúteo-femoral (Hachem y Borgoin, 1979), por otro lado, favorece el drenaje linfático y activa la síntesis de colágeno en los fibroblastos. Todo ello implica una disminución de la presencia de celulitis en la mujer (Distante y col., 2006).

Las plantas son una fuente de productos para el mercado farmacéutico, alimenticio y cosmético, ejemplos de plantas que se usan en esta campo son el *Aloe vera*, la caléndula, el Ginkgo o la valeriana. Las fuentes para obtener estos productos usados en el campo cosmético están limitadas al mundo vegetal y a compuestos sintéticos ya que el uso de fuentes animales es criticable, de igual modo que la utilización de productos modificados genéticamente.

Sin embargo, a veces, no es del todo eficiente usar las plantas como fuente de compuestos de interés, debido a la presencia de productos tóxicos, a un lento crecimiento o a su difícil recolección, por ello, la utilización de la tecnología de cultivos celulares puede ser una solución a estos problemas. En el campo de la cosmética no esta muy establecido, pero existen ejemplos de cultivos celulares utilizados en la producción industrial de algunos compuestos, como la sikonina (un pigmento rojo) sintetizada por *Lithospermum erythrorhizon* producida por Mitsui Petrochemical Industries, la arbutina (agente blanqueador) sintetizada por *Catharanthus roseus* o cartamina por *Carthamus tinctorius*, ambos compuestos producidos por Kibun.

Actualmente, según la *European patent office* existen unas 200 patentes relacionadas con *C. asiatica*, con una amplia gama de usos que van desde formulaciones para mejorar la memoria, la proliferación fibroblástica y de esta manera reparar el tejido epitelial, fórmulas cosméticas para pieles envejecidas, etc. También se han mejorado los extractos de planta para que presenten un mayor porcentaje de principios activos o los sistemas de preparado de los extractos.

1.2.4-. Mecanismos de acción

Del Vechio y col., en 1984 determinaron en cultivos de células embrionarias humanas, que los extractos purificados de *C. asiatica* producían un estímulo en la síntesis de lípidos y glucosaminoglicanos, en especial ácido hialurónico y condroitinsulfato. De esta manera, dichos extractos lograron estimular a los componentes amorfos glucosaminoglicanos, en menor medida

Introducción

a los componentes fibrilares y con efecto nulo sobre el crecimiento celular. También se pudo observar una reducción marcada en los niveles de ácido urónico y de las enzimas lisosomales relacionadas con el metabolismo de los mucopolisacáridos (β -glucuronidasa, β -N-acetilglucosaminidasa y arilsulfatasa). Todo esto implicaría el desarrollo de un tejido conectivo normal y un correcto proceso de reepitelización (Del Vecchio y col., 1984).

La acción comentada se debe, principalmente, al asiaticósido (Shukla y col., 1999a) y sus derivados, que producen un aumento en la inducción de niveles antioxidantes en la etapa inicial del tratamiento, y se puede suponer que es un factor importante en las propiedades curativas de estas sustancias (Shukla y col., 1999b).

Las saponinas triterpénicas de *C. asiatica* estimulan la síntesis del colágeno y de mucopolisacáridos. En ensayos *in vitro* con cultivos de fibroblastos humanos, a dosis bajas, se ha demostrado un estímulo en la producción de colágeno (Maquart y col., 1990). Además, específicamente el asiaticósido, *in vitro*, estimula la epidermis activando las células de Malpighi y la queratinización (May, 1968). También, inhibe la proliferación de queratinocitos, lo que explica su utilidad en la psoriasis y como preventivo de la formación de cicatrices queloides (Sampson y col., 2001). Los mucopolisacáridos son los principales componentes de la matriz celular que mantienen la integridad vascular. A este nivel, la acción bioquímica de los extractos de *C. asiatica* es reducir los niveles de enzimas lisosomales relacionadas con la degradación de los mucopolisacáridos.

Los extractos de esta planta, también provocan un aumento de los niveles cerebrales de GABA, lo que le confiere propiedades sedativas, hipnógenas y ansiolíticas, que son dosis-dependientes.

Velasco y Romero en 1976 descubrieron que tanto la fenilbutazona como la exametasona (dos corticoesteroides) interfieren en la velocidad de reparación inducida por asiaticósido en heridas experimentales en rata, siendo más pronunciada la interferencia dada por fenilbutazona ya que este compuesto normalmente disminuye la capacidad de reparación tisular orgánica. Al parecer, el sitio de interacción estaría en las membranas lisosomales, lugar de acción de los antiinflamatorios, que actúan estabilizando las mismas, impidiendo la liberación de las enzimas correspondientes (Alonso, 1998).

Tanto el asiaticósido como el ácido madecásico han sido descritos como agentes antiinflamatorios (Jacker y col., 1982). Los autores concluyeron que el asiaticósido estimula selectivamente el sistema retículo-endotelial, como lo hacen las bioestimulinas de Filatov en la formación de colágeno (Ali y col., 1997).

1.2.5- Farmacocinética

Chassaud y colaboradores en 1971 estudiaron la biodisponibilidad y el metabolismo del asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático en ratas, utilizando marcadores radioactivos. Después de la administración oral de un extracto que contenía las tres sustancias, se pudo comprobar que los compuestos eran eliminados alrededor de 5 días, después de la administración. El asiaticósido es hidrolizado por la microflora del intestino grueso en ácido asiático, el 90% del ácido asiático es excretado en las heces, 2,1% en orina, 1,1% en aliento y sólo el 2,6% permanecía aun en los tejidos del animal después de seis días. En voluntarios sanos se pudo constatar que la tasa plasmática de ácido asiático, después de una administración prolongada de la fracción triterpénica total de *C. asiatica*, era superior a la encontrada tras la administración única de la dosis total. Ello explica, la existencia de una interacción metabólica entre el ácido asiático y el asiaticósido, compuesto que en el organismo se transforma en ácido asiático (Grimaldi y col., 1990).

1.2.6- Toxicidad

El principal efecto secundario de los tratamientos con extractos de *C. asiatica*, es la posible aparición de reacciones alérgicas en determinados casos, sobre todo si se utiliza por vía tópica, pudiendo ocasionar dermatitis de contacto (Danese y col., 1994). Aunque algunos test revelan que las reacciones alérgicas podrían estar inducidas por otros componentes del preparado que se ha administrado (Hausen, 1993).

La OMS sugiere que los extractos de *C. asiatica* estarían contraindicados en personas sensibles a otras plantas de la familia de las Apiáceas. En relación con el consumo durante el embarazo y en el periodo de lactancia, aún no se ha comprobado totalmente su inocuidad, pero los estudios realizados hasta el momento, sugieren que no produce daño al desarrollo fetal y médicos italianos lo han administrado a embarazadas. Sin embargo, otros autores aseguran que es abortivo en altas dosis.

También se ha observado que los extractos de *C. asiatica*, a altas dosis y por vía oral pueden provocar cefaleas, vértigos, hipotensión arterial y estados narcóticos leves-moderados. Su aceite esencial sería el responsable de estos trastornos, por ello, se prefiere administrar por vía oral la fracción triterpénica.

Introducción

1.3-. Utilización de los cultivos celulares para la producción de metabolitos secundarios

Las plantas son una fuente importante de productos naturales, los cuales pueden conferir al vegetal que los contiene diferentes propiedades medicinales. Estos compuestos, mayoritariamente provienen de su metabolismo secundario que tiene como función principal la de ayudar a la planta a interactuar con el medio ambiente. Los compuestos secundarios pueden actuar como un sistema de defensa de las plantas, intervenir en su reproducción, por ejemplo para atraer a los polinizadores o en las relaciones de competencia alelopáticas entre plantas. Por otro lado, para el ser humano, estos mismos metabolitos son utilizados como medicamentos, agentes agro-químicos, colorantes, aromatizantes, aditivos alimentarios y pesticidas (Verpoorte y Memelink, 2002).

Por ello, la búsqueda de nuevos productos derivados de las plantas ha sido una prioridad en las últimas décadas, pero realizando una explotación racional, con el fin de conservar la biodiversidad existente en nuestro planeta (Phillipson J. D. 1990).

En la búsqueda de sistemas alternativos para la producción de compuestos medicinales de origen vegetal, los procesos biotecnológicos, específicamente, los cultivos *in vitro*, pueden constituir una alternativa o complemento a los sistemas agrícolas para la producción de compuestos bioactivos en las plantas (Rao y Ravishankar, 2002). Los cultivos celulares pueden ser utilizados para la producción a gran escala de metabolitos secundarios. La ventaja de este método es que pueden proporcionar una fuente continuada de productos naturales. Además, los cultivos *in vitro*, pueden proporcionar técnicas alternativas para la rápida propagación clonal de plantas medicinales en riesgo de extinción y/o modificadas genéticamente (Vanisree y col., 2004).

El desarrollo de cultivos celulares capaces de producir compuestos medicinales a un nivel similar o superior que la planta intacta se ha incrementado en los últimos años. Nuevas sustancias fisiológicamente activas y de interés medicinal se han encontrado utilizando diferentes bioensayos. También se ha demostrado, que la capacidad biosintética de los cultivos celulares puede ser mejorada variando las condiciones ambientales del cultivo, o seleccionando líneas celulares altamente productivas. Algunos compuestos medicinales localizados en tejidos y órganos específicos de las plantas han sido producidos, no sólo, en cultivos de órganos aislados, sino también en cultivos celulares, compuestos por células no especializadas (Tabla 3).

Tabla 3 -. Metabolitos secundarios de interés obtenidos en cultivo *in vitro* de plantas.

Nombre de la planta	Principio activo de interés	Tipo de cultivo
<i>Agave amaniensis</i>	saponinas	callos
<i>Ailanthus altissima</i>	alcaloides	suspensión
<i>Capsicum ensiformis</i>	capsaicin	suspensión
<i>Cinchona L.</i>	alcaloides	suspensión
<i>Coffea arabica L.</i>	cafeína	callos
<i>Dioscorea deltoidea</i>	diosgenina	suspensión
<i>Mentha arvensis</i>	terpenoides	raíces
<i>Mucuna pruriens</i>	L-DOPA	suspensión
<i>Nicotines tabacum L.</i>	nicotina	suspensión
<i>Panax ginseng</i>	saponinas y sapogeninas	callos
<i>Papaver somnifereum L.</i>	morfina - codeína	suspensión
<i>Portulaca grandiflora</i>	betacianina	callos
<i>Taxus sp.</i>	taxol	suspensión
<i>Thalictrum minus</i>	berberina	suspensión

Por otro lado, también se ha demostrado el posible uso de los cultivos de células y de órganos para conseguir la biotransformación de algunos compuestos naturales (Rao y Ravishankar, 2000; Hakkinen y col., 2005). Debido a todos estos avances, la investigación en el área de la tecnología de los cultivos *in vitro* está hoy en un momento de máximo desarrollo.

De acuerdo con Vanisree y col. (2004) las principales ventajas de los cultivos celulares sobre los cultivos convencionales son:

- La producción puede conseguirse en condiciones controladas con independencia de factores climáticos o las condiciones del suelo.
- Los cultivos están libres de microorganismos.
- Las células de una planta alpina o tropical pueden ser fácilmente multiplicadas para cosechar sus metabolitos específicos
- El control automatizado y la regulación racional del crecimiento y el metabolismo pueden reducir costes y mejorar la productividad.
- Las sustancias orgánicas son fácilmente extraíbles de las células o de los medios de cultivo.

Los avances en los cultivos *in vitro* combinados con las técnicas de ingeniería genética, específicamente, la tecnología de la transformación vegetal, han abierto nuevas vías para la producción de medicamentos, nutracéuticos, y otras sustancias beneficiosas (Hansen y Wright,

Introducción

1999). Los avances recientes en biología molecular, enzimología y tecnología de la fermentación, con cultivos celulares confirman que este sistema puede constituir una fuente importante para la producción de metabolitos secundarios de las plantas. La investigación en esta área ha dado como resultado la producción de numerosos medicamentos para nuevas terapias. La utilización de los cultivos celulares para la producción de medicamentos ha hecho posible la bioproducción de numerosos compuestos como alcaloides, terpenoides, esteroides, fenoles simples, flavonoides y aminoácidos, entre otros (Vanisree y col., 2004).

En el mercado mundial existen diferentes empresas que comercializan productos con alto valor añadido obtenido por cultivos celulares, como son Mitsui Petrochemical Industry Co. Ltd. (Japón) productora de shikonina mediante cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon*, Nitto Denko Corp. productora de purpurina a partir de *Rubia akane* o la producción de taxol a partir de *Taxus cuspidata* por Phyton/Bristol-Myers Squibb Co., todas ellas demuestran la aplicabilidad biotecnológica de las suspensiones celulares (Vasconsuelo y Boland, 2007).

1.3.1-. Estrategias para la mejora de los cultivos celulares

En los últimos años con el avance de los sistema de cultivo *in vitro*, también se han desarrollado toda una serie de estrategias dirigidas hacia la mejora de la producción de los sistemas biotecnológicos. Destacando las siguientes:

- Búsquedas de líneas celulares con elevada producción del metabolito de interés
- Obtención de medios de cultivo y condiciones óptimas para la producción
- Inmovilización de células
- Sistemas de elicitación
- Biotransformación celular
- Escalado de cultivos celulares a biorreactores

1.3.1.1-. Selección de líneas celulares con elevada producción del metabolito de interés

El primer paso para la obtención de líneas celulares es partir de un material vegetal que presente elevado contenido del metabolito de interés. Las líneas celulares son biosintéticamente totipotentes, lo cual significa que cada célula presenta toda la información genética de la especie vegetal y por consiguiente puede producir el mismo rango de productos que la planta original.

Algunos métodos para la selección de líneas altamente productivas son la adición de inhibidores tóxicos al cultivo o someterlas a algún estrés ambiental de manera que se seleccionen aquellas que crezcan mejor bajo esas condiciones. Ejemplo de esto, es la utilización del p-fluorofenilalanina, análogo de la fenilamina, para la selección de líneas celulares de mayor

producción de fenoles (Berlin, 1980). Otra estrategia es la mutagénesis de las suspensiones para obtener células que sobreexpresen el metabolito de interés (Rao y Ravishankar, 2002).

1.3.1.2-. Obtención de medios nutritivos de producción y de las condiciones optimas de cultivo

La expresión de algunas vías del metabolismo secundario puede ser alterada por factores externos como nutrientes, reguladores del crecimiento, luz o temperatura entre otros.

En los medios de crecimiento, los niveles de azúcares (fuente de carbono), o los niveles de nitrato o fosfato se han descrito como factores que pueden ser modificados y así variar la concentración del producto.

Por otro lado, unos de los factores claves para la producción del principio activo de interés es la utilización de reguladores del crecimiento. Este es el caso de las citoquininas, cuyo efecto puede variar dependiendo del tipo de metabolito y la especie. Esto se ha podido comprobar en cultivos de *Haplopappus gracilus*, en los cuales estimula la producción de antocianina mientras que en cultivos celulares de *Populus* inhibe la formación de los mismos compuestos.

Otra forma de mejorar la producción es optimizando factores como la luz, temperatura, pH u oxígeno, los cuales también afectan a la producción de los metabolitos secundarios (Rao y Ravishankar, 2002).

1.3.1.3-. Inmovilización celular

El metabolismo secundario se puede considerar como una forma de especialización, en la que existe una clara relación entre células diferenciadas y la producción de metabolitos secundarios. Uno de los ejemplos más visibles de esta relación entre estructuras organizadas y producción de metabolitos secundarios son las flores y los pelos glandulares. A nivel biotecnológico, existen sistemas de producción de alcaloides tropanicos que se basan en cultivos de raíces, ya que existe una mayor producción de los compuestos de interés que no en cultivos celulares no organizados.

Este factor hace que la inmovilización de células sea usada como estrategia para mejorar la producción de los principios activos. La técnica consiste en crear agregados que permiten un cierto contacto entre células y por consiguiente mayor grado de organización. Generalmente, las células se agregan mediante diferentes tipos de geles como agar, agarosa, gelatina, poliacrilamida o alginato cálcico (Osuna y col., 2008).

Introducción

El problema que a veces presenta esta técnica, es lo costosa que puede resultar a largo plazo debido a que, a veces, los metabolitos no se excretan al medio, lo que obliga a usar otros procesos para su liberación, como son sistemas de sonicación o la utilización de disolventes orgánicos provocando el encarecimiento del sistema.

1.3.1.4- Sistemas de elicitación

Los elicitores se han descrito como moléculas implicadas en las interacciones planta-microorganismo y por tanto relacionados con la formación de fitoalexinas (moléculas producidas en respuesta a una infección).

Sin embargo, la propiedad característica de estos compuestos en cultivos celulares es su capacidad de activar el metabolismo secundario. De esta manera, la adición de elicitores a un cultivo puede incrementar la producción de principios activos de interés que generalmente proceden del metabolismo secundario. Aunque el efecto de estos elicitores puede variar dependiendo de la concentración, la duración del tratamiento, y por otro lado del tipo de cultivo (Vasconsuelo y Boland, 2007).

Actualmente se utilizan compuestos tanto bióticos (jasmonato de metilo, ácido araquidónico, quitosan, etc.) como abióticos (estrés osmótico, iones metálicos), ambos tipos de compuestos suelen favorecer la producción.

1.3.1.5- Biotransformación celular

Las biotransformaciones son aquellas reacciones catalizadas por enzimas, total o parcialmente purificadas, en forma libre, inmovilizadas o como células completas (Roberts y Shuler, 1998). El uso de esta técnica en síntesis orgánica, tanto a nivel industrial como de laboratorio, se ha incrementado de forma exponencial en los últimos años (Roberts, 2007).

La primera consideración para incluir una biotransformación en una secuencia sintética es la quimio-, regio- y estereoselectividad que ofrecen las reacciones catalizadas por enzimas (Loughlin 2000). Adicionalmente, las enzimas son catalizadores eficientes, usualmente compatibles unas con otras, las condiciones de reacción en las cuales trabajan son suaves; promueven reacciones que resultan difíciles o imposibles usando técnicas tradicionales de síntesis orgánica y actúan en medios acuosos, aunque también pueden ser utilizadas en disolventes orgánicos como medios de reacción (León y col., 1998).

En la actualidad la mayoría de las biotransformaciones que se realizan en síntesis orgánica emplean hidrolasas, oxidoreductasas, transferasas, liasas e isomerasas. La selección de un biocatalizador exige la consideración de algunos factores que deben tomarse en cuenta, ya que

pueden usarse desde enzimas puras, enzimas parcialmente purificadas, células completas de microorganismos, de plantas o de animales.

Los factores a tener en cuenta son:

- i-. el tipo de reacción a catalizar
- ii-. la existencia de cofactores involucrados
- iii-. la escala en la que se llevara a cabo la biotransformación

Además se deben considerar las ventajas y desventajas en el uso de cada clase de biocatalizador.

1.3.1.6- Escalado de los cultivos celulares a nivel de biorreactores

El último paso en los cultivos celulares es la producción en biorreactor, pero este paso no siempre es fácil, pues se ha observado que la configuración del biorreactor puede diferir dependiendo de las características de las células vegetales, el tipo de proceso y sobre todo, si se trata de cultivos organizados. Por ello, no se puede considerar un sólo diseño común para todas las situaciones, de esta manera el metabolito en cuestión que se pretende producir biotecnológicamente tiene que presentar un alto interés económico. Actualmente, se considera que la producción de un compuesto de un valor inferior a 1000 US\$ por kilogramo, sólo se llevará a nivel de biorreactor cuando se prevea un gran interés y una demanda en el mercado creciente, para que finalmente la producción sea rentable (Rao y Ravishankar, 2002).

1.3.2- Técnicas de micropropagación de *Centella asiatica*

En la década de los 90, los requerimientos anuales de *C. asiatica* eran del orden de 12.700 toneladas de materia seca valorados en 1,5 billones de dólares. El suministro de esta planta se obtiene, principalmente, de las poblaciones silvestres. Debido a la explotación a gran escala y sin restricción de este recurso natural, junto con su cultivo limitado y las escasas tentativas que se han desarrollado para su repoblación, las plantas silvestres de esta especie se están agotando y desde los años 90 figura entre las especies en riesgo de extinción según la IUCN [Union for Conservation of Nature and Nacional Resources] (Pandey N. y col. 1993) .

De acuerdo con el Banco de Importaciones y Exportaciones de la India, *C. asiatica* es una de las especies vegetales con un mercado internacional más amplio en el ámbito de las plantas medicinales (Rao y Ravishankar, 2000). Debido a la necesidad de conservar el germoplasma de *C. asiatica*, son varios los intentos que se han realizado para micropropagar esta planta. Hasta el

Introducción

momento, ha sido descrita la regeneración de brotes de *C. asiatica* a partir de callos (Patra y col., 1998; Banerjee y col., 1999), de tallos (Patra y col., 1998) y de segmentos nodales (Tiwari y col., 2000).

El grupo de Paramageethan regeneró plantas, partiendo de segmentos de hojas de *C. asiatica*, de los cuales, se obtuvieron embriones somáticos al cultivar los explantos en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con quinetina 9,29 μM en combinación con 2,26 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2.4-D). Después de una semana de cultivo, en las condiciones indicadas, los fragmentos de hojas generaron masas granulares de callo, que tras cuatro semanas desarrollaron embriones somáticos, en la etapa de corazón y cotiledonaria. Los embriones somáticos maduraron y germinaron en medio MS que contenía 2,32 μM de quinetina y 2,89 μM de GA₃ desarrollando, posteriormente, plántulas viables (Paramageetham y col., 2004).

Recientemente, el grupo de Mohapatra (2008) también ha regenerado plantas de *C. asiatica* a partir de segmentos de hoja y de nodo, en medio MS suplementado con distintas combinaciones de reguladores del crecimiento. El mayor porcentaje de regeneración se observó en medio MS suplementado con 3 mg/l de BAP y 0,05 mg/l de NAA. En hojas, se observó un 81,6% de regeneración mientras que a partir de segmentos nodales, el porcentaje de regeneración fue inferior. En sucesivos cultivos, el material vegetal se transfirió a un medio de formación de raíces, que contenía medio MS, con la concentración salina reducida a la mitad y suplementado con 0,5 mg/l IBA, llegando a un 76,8% de enraizamiento. Más tarde, las plantas fueron aclimatadas en Vermi-compost y transferidas posteriormente al suelo. Los contenidos de clorofila, azúcares totales y proteínas fueron analizados tanto en hojas *in vitro* como *ex vitro*, pudiendo observarse que el contenido de clorofilas era más alto en plantas *ex vitro* mientras que el resto de compuestos analizados era más alta en plantas *in vitro* (Fig. 14) (Mohapatra y col., 2008).

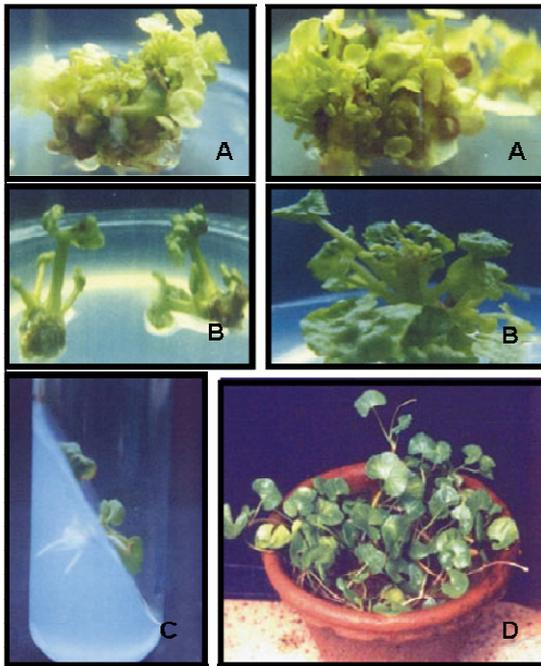


Figura 14-. Regeneración de *C. asiatica* a partir de hoja (A), y segmentos nodales (B), enraizamiento de las plántulas obtenidas tanto por hoja como por nodo (C) y aclimatación *ex vitro* (D).

La embriogénesis somática se ha utilizado con éxito para la micropropagación de numerosas especies vegetales. Esta técnica junto con la producción de mutantes, la obtención de semillas artificiales y la aplicación de técnicas de ingeniería genética vegetal, permiten abrir nueva vías para la manipulación genética de *C. asiatica* y de este modo conseguir un sistema sostenible para la obtención de material vegetal (Rao y Ravishankar, 2000).

Los escasos resultados obtenidos hasta fechas recientes sobre la producción *in vitro* de los compuestos bioactivos de *C. asiatica*, indujeron a Kim y colaboradores (2004) a desarrollar cultivos de plántulas de esta especie en condiciones *in vitro*. De los resultados obtenidos por este grupo destaca, la fácil adaptación de esta planta al cultivo en biorreactor de tipo "airlift" y el efecto del elicitador jasmonato de metilo sobre la producción de asiaticósido, uno de los principales principios activos de interés farmacológico de los extractos de centella.

1.3.3-. Cultivos *in vitro* de *Centella asiatica* y ensayos de producción biotecnológica

A pesar del interés medicinal de *C. asiatica* (ver apartado 1.2.3 de la Introducción) son pocos los esfuerzos que se han desarrollado hasta el momento, para conseguir la producción biotecnológica de sus principios activos.

Los cultivos de callo y suspensiones celulares de esta especie vegetal, fueron iniciados en el laboratorio del Prof. Guignard (Bister-Miel F., 1987), y hasta hace pocos años, esta era la

Introducción

única suspensión celular lograda de la especie. Las suspensiones celulares se obtuvieron en 2 pasos: primero se iniciaron cultivos de callo en medio sólido, para transferirse posteriormente a medio líquido. Las semillas de *C. asiatica* se hicieron germinar asépticamente y se cortaron fragmentos de tallo de las plántulas que se sembraron en medio Nitsch and Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969) adicionado de 2,4-D a la concentración de 0,1 mg/l. Una vez desarrollado el callo, éste fue subcultivado cada 4-6 semanas en medio MS, que contenía adenina, quinina, 2,4-D y glucosa, el crecimiento insuficiente del callo obligó a los investigadores a sustituir la quinina por 6-bencilaminopurina. Tres meses después de la inducción, cuando el callo había crecido suficientemente, se transfirió a medio líquido, donde espontáneamente fue disgregado obteniéndose una suspensión celular. Estas suspensiones han sido mantenidas durante años subcultivándose cada semana a una dilución 1/11. La curva de crecimiento de las mismas, muestra que tienen una fase de retardo de 2 días, a partir de donde se inicia un crecimiento exponencial hasta el día 12 y posteriormente el día 14 entran en fase de crecimiento estacionario. La suspensión se ha mantenido durante más de 18 años y ha sido utilizada por numerosos investigadores en sus experimentos.

Una de las investigaciones realizadas con esta línea celular fue su utilización para biotransformar papaverina en papaveraldina (Bister-Miel F., 1987) y para desmetilar la tiocolchicina (Bouhouche y col., 1998).

Como ya se ha indicado, *C. asiatica* contiene triterpenos bioactivos que presentan el anillo del ursano. Diversos estudios no publicados han confirmado la escasa o nula capacidad de la suspensión celular obtenida por Guignard para sintetizar estos compuestos (comunicación personal). Por ello, diferentes autores han inducido cultivos de raíces transformadas de esta planta, utilizando el sistema *Agrobacterium rhizogenes*. De esta forma, Woong y col. (1996) optimizaron las condiciones para la transformación y el posterior cultivo de las raíces, sin informar sobre la capacidad de las mismas para producir saponinas triterpénicas (Paek y col., 1996).

Recientemente, Omar y col. (2005) realizaron un estudio sistemático considerando las variables, concentración de sacarosa, ácido indolacético (AIA) y 6-benciladenina (BA) para optimizar el crecimiento de la línea celular de *C. asiatica*. El experimento planteado utilizó el sistema RSM (Response Surface Methodology) y con él se demostró que la sacarosa a una concentración de 6,68% (p/v) junto con 0,84 mg/l de AIA y 1,17 mg/l de BA consiguen la mayor producción de biomasa del cultivo (Omar y col., 2005).

Paralelamente, Nath y Buragohain (2005) establecieron nuevas suspensiones celulares de *C. asiatica*. Para ello, utilizaron diferentes concentraciones de BA, ácido α -naftalenacético (ANA) y 2,4-D. Los mejores resultados para la obtención de callo friable los lograron con 1 mg/l de NAA y BA, tras 35 días de cultivo. A partir de este callo, desarrollaron cultivos celulares que crecieron en el mismo medio, y alcanzaron una producción de asiaticósido del orden de 490 μ g/l, mientras que los otros componentes activos de los extractos de *C. asiatica* no fueron determinados (Nath y Buragohain, 2005).

Los cultivos *in vitro*, también han sido utilizados para caracterizar diferentes fenotipos de *C. asiatica*, de este modo, el grupo de James en 2008 caracterizó dos fenotipos sudafricanos, analizando los 4 principios de interés farmacológico (madecasósido, asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático), en células no diferenciadas (callos y suspensiones celulares) y en hoja. Estos estudios permitieron determinar la diferencia entre los dos fenotipos y la mayor presencia de saponinas en hojas que en el material no diferenciado, presentando las hojas unos contenidos de glucósidos del 1,8 y del 5% para las geninas (James y col., 2008).