

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



Resultados y Discusión

3.1-. Obtención de material vegetal

3.1.1-. Semillas naturales

Las dificultades encontradas para obtener material biológico de *Centella asiatica* y las complejas condiciones de cultivo de las plantas de esta especie, condujeron a que nos planteáramos en nuestros objetivos, el desarrollo de un protocolo para disponer de una fuente continuada de material estéril de esta planta, independientemente de las condiciones ambientales. Para ello, partimos de semillas *C. asiatica* var. *typica* procedentes de China (ver apartado 2.1 de Materiales y Métodos) que se sembraron en condiciones estériles en placas de Petri que contenían medio MS completo sin adicionar reguladores del crecimiento.

Como puede observarse en la tabla 18 las semillas de *C. asiatica* no germinaron en estas condiciones (medio control), por lo que se procedió a realizar diferentes tratamientos para favorecer el proceso. Las semillas de centella son de pequeño tamaño y cubierta muy coriácea, por lo que tratamientos físicos, como la escarificación y/o un ligero aplastamiento que rompa las cubiertas, son suficientes para inducir la germinación de las mismas. La quiescencia de algunas semillas se debe a que poseen una capa externa impermeable, y no germinarán hasta que esta cubierta se vea alterada.

Tabla 18-. Porcentaje de germinación de las semillas de *C. asiatica* en medio MS, sometidas a diferentes tratamientos, después de 6 semanas de cultivo.

Tratamiento	Control	Giberelina	Escarificación	Aplastamiento
% de germinación	0%	7%	14%	16%
<p><u>Control:</u> semillas no tratadas</p> <p><u>Giberelina:</u> inmersión de las semillas, en agitación, en una solución de GA3 (10-μM) durante 6-8 h.</p> <p><u>Escarificación:</u> corte longitudinal de la cubierta de la semilla.</p> <p><u>Aplastamiento:</u> se somete a las semillas, en condiciones estériles, a una presión que induce la formación de grietas en su cubierta.</p>				

Por otro lado, de los valores de germinación de la tabla 18 también se deduce que la giberelina (GA3) activó significativamente el proceso. Este grupo de hormonas vegetales favorece la germinación de semillas en muchas especies, al promover la liberación y/o síntesis *de novo* de enzimas hidrolíticas como la α -amilasa que activan la germinación (Iglesias D. J. y col. 2008) por lo que no es de extrañar que también en *C. asiatica* se active este proceso. El estudio estadístico

Resultados y discusión

de los resultados demostró que existían diferencias significativas entre los tratamientos utilizados. Los tratamientos físicos de escarificación y aplastamiento provocaron valores similares y a la vez significativamente superiores de las tasas de germinación (Anexo Tabla 1; P-valor=0.0000).

En su conjunto, nuestros resultados demuestran que los 2 tipos de tratamientos, físicos y químicos, activan el proceso de germinación de las semillas, por ello, en experimentos posteriores aplicamos ambos tratamientos combinados (inmersión en GA₃ y aplastamiento) para mejorar el proceso, llegando a tasas de germinación del orden del 50%.

En la figura 44, se puede observar el aspecto de una plántula desarrollada en condiciones *in vitro*, tras 8 semanas de cultivo en medio MS. Las plántulas obtenidas, tenían una morfología normal, similar a la de las plantas desarrolladas en los cultivos en tierra (Fig. 45), sin presentar síntomas de vitrificación, muy frecuentes cuando se desarrollan las plantas *in vitro* (Sudria y col., 1999) y que se caracterizan por un acúmulo excesivo de agua en los tejidos vegetales, que provoca malformaciones en el desarrollo de hojas y tallos.



Figura 44-. Aspecto de una plántula de *C. asiatica* obtenida de semillas germinadas *in vitro* en medio MS sin reguladores del crecimiento.



Figura 45-. Aspecto de las plántulas de *C. asiatica* obtenida de semillas germinadas en tierra, previo a un tratamiento con GA₃ (10⁻⁴ M).

Cuando las plántulas alcanzaron un tamaño de aproximadamente 1 cm, fueron transferidas a frascos "Baby food" (Sigma) para que continuaran su desarrollo, subcultivándose mensualmente en medio MS sin reguladores del crecimiento. En estas condiciones, pese a que estas plantas se han subcultivado durante más de 3 años no se ha producido la floración de ningún ejemplar. También se ha visto muy limitada la capacidad de las mismas para producir estolones, el sistema de reproducción vegetativa que desarrolla esta especie vegetal, para propagarse en la naturaleza (Mukerji, 1953). En la Figura 46, se muestra la secuencia de tres subcultivos a los que han sido sometidos diferentes ejemplares. En una etapa posterior, algunas de las plantas que

habían alcanzado el tamaño correspondiente al de un individuo adulto (Fig. 47), fueron transferidas a tierra, logrando una fácil aclimatación.



Figura 46-. Curso de desarrollo de las plántulas de *C. asiatica* cultivadas *in vitro*, a lo largo de tres subcultivos sucesivos de cuatro semanas cada uno.



Figura 47-. Aspecto de una planta adulta de *C. asiatica* desarrollada en condiciones *in vitro*.

3.1.2.- Germinación *in vitro* de semillas artificiales

Entre las ventajas de la encapsulación de nódulos meristemáticos, se citan su capacidad de mantener el potencial de germinación, el fácil manejo debido a su pequeño tamaño y el presentar una gran uniformidad génica. Las plantas con interés comercial, a veces no pueden ser propagadas mediante semillas naturales, por ser difícil su obtención o porque a veces implicaría una pérdida de las características deseables, por ello, la utilización de sistemas de propagación

Resultados y discusión

vegetativa, como es el caso de las semillas artificiales, podría representar una solución a estos problemas.

Las semillas artificiales utilizadas en este trabajo, se obtuvieron a partir de fragmentos meristemáticos de *C. asiatica*, que fueron incluidos en perlas de alginato, según se describe en el apartado 2.1.2.2 de Materiales y Métodos.

Las semillas germinaron a partir de los 15 días después de sembrarlas en medio SH y SH-ML (SH modificado). Observando, inicialmente la formación de una pequeña raíz y más tarde, el desarrollo de la parte aérea, hasta desarrollar la plántula completa (Fig. 48). Las tasas de germinación obtenidas en los dos medios presentaron diferencias significativas (Anexo Tabla 1B- P-valor=0.0021). La capacidad germinativa fue superior en el medio SH-ML que en el SH (Tabla 19), donde se alcanzó una tasa de germinación cercana el 95%, valor significativamente superior al alcanzado por las semillas naturales, incluso cuando estas fueron sometidas a tratamientos físicos y/o químicos para su germinación (Fig. 49).

Tabla 19-. Resultados del cultivo de semillas artificiales de *C. asiatica*.

Medio	SH	SH-ML
% de germinación	64	95

Las plántulas obtenidas, se transplantaron en frascos “baby food” con medio SH-ML y se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura óptimas. Las plántulas se han subcultivado, periódicamente cada 30 días, durante varios años.

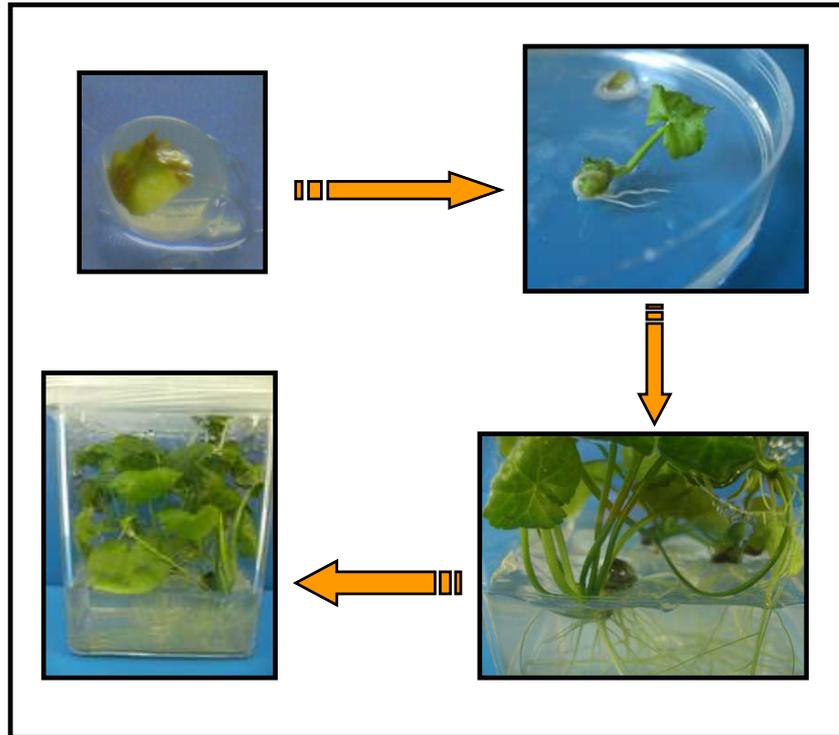


Figura 48-. Proceso de germinación y desarrollo *in vitro* de una semilla artificial.

La morfología de las plantas obtenidas a partir de semillas artificiales no presentó diferencias relevantes, en relación con las procedentes de semillas naturales. Como únicos datos destacados, en la figura 49, se puede observar que las plántulas procedentes de semillas artificiales presentaban tamaños más pequeños pero con las hojas más grandes y un número menor de raíces, aunque éstas eran más ramificadas, que las desarrolladas a partir de semillas naturales (Fig. 50).



Figura 49-. Aspectos de las plantas de *Centella asiatica* obtenidas a partir de semillas artificiales (izquierda) y naturales (derecha), en medio SH-ML, 2 meses después de la germinación.

Resultados y discusión

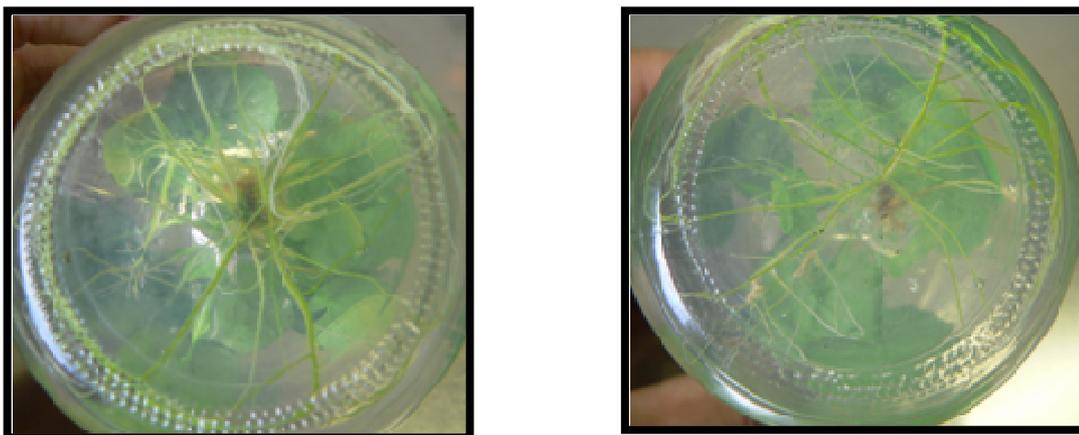


Figura 50-. Comparación del crecimiento de raíces de plantas obtenidas a partir de semillas naturales (derecha) y de semillas artificiales (izquierda).

En los últimos años, la obtención de semillas artificiales se ha utilizado ampliamente como un fácil sistema de micropropagación (Naik y Chand, 2006), pero podría tener además, un gran interés en la conservación de germoplasma, si se utilizan técnicas apropiadas de almacenamiento como podría ser en condiciones de baja temperatura.

Con el propósito de comprobar la capacidad de las semillas para ser almacenadas durante largos periodos de tiempo, se mantuvieron a baja temperatura (4°C) durante 6 meses, y se sacaron muestras mensualmente, con el propósito de investigar el mantenimiento de su capacidad germinativa (Tabla 20).

Tabla 20-. Resultados de germinación de semillas artificiales que se han sometido a frío.

	Inicio	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses
% Germinación	95	46,4	35,5	12	3	0	0

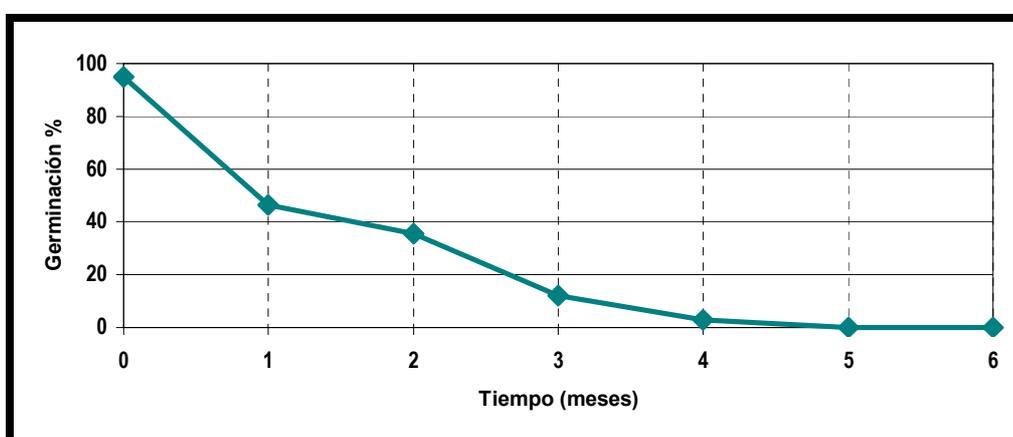


Figura 51-. Tasa de germinación de semillas artificiales de *C. asiatica* sometidas a 4°C de temperatura.

Los valores de las tasas de germinación mostrados en la tabla 20 revelan que las semillas artificiales pierden gradualmente su capacidad germinativa al ser almacenadas y que periodos de almacenamiento superiores a los 2 meses provocan un drástico descenso de esta capacidad (Fig. 51). En su conjunto, nuestros resultados demuestran que la obtención de semillas artificiales constituye un sistema adecuado para la micropropagación de la especie, puesto que de una sola planta se puede obtener un gran número de material vegetal, siendo todas las plantas obtenidas, clones de la inicial. Por el contrario, nuestros resultados también demuestran que las semillas artificiales no constituyen un buen sistema para la conservación del germoplasma de esta especie, por períodos de tiempo prolongados, puesto que pierden su viabilidad tras 4 meses de almacenamiento en cámaras frías.

Este comportamiento es bastante general, por ejemplo, en segmento nodales de granada (*Punica granatum*) la tasa de germinación variaba entre el 64%-36% durante los 15-30 días, mientras que a partir del mes la germinación disminuía significativamente, y después de 60 días se perdía completamente la viabilidad (Naik y Chand, 2006). En el guayabo (*Psidium guajava*), después de 45 días de almacenamiento, las semillas artificiales ya no germinan (Rai y col., 2008), en el caso de la camelia (*Camellia japonica* L. y *Camellia reticulata* Lindley) a los 30 días de almacenamiento se produce una reducción hasta el 50% de la germinación, mientras que después de 4 meses sólo germinaban el 1% de las semillas (Ballester y col., 1997). Diferentes autores han atribuido esta reducción en la supervivencia, a la falta de disponibilidad del oxígeno provocada por la encapsulación (Rai y col., 2008).

3.2-. Desarrollo de un sistema óptimo para la inducción de tejido de callo

Uno de los mayores inconvenientes de la tecnología del cultivo *in vitro* es la escasa reproducibilidad de muchos de los resultados obtenidos previamente. Por ello, en la etapa inicial de este trabajo, para la obtención de callo de *Centella asiatica*, utilizamos como medios de inducción algunos que ya se habían probado con éxito por otros autores con esta misma planta (Banerjee y col., 1999), junto con otros, probados previamente en nuestro Laboratorio, y efectivos para la inducción de callo de otras especies vegetales (Piñol y col., 1987; Bentebibel y col., 2005; Moyano y col., 2006).

Los ensayos preliminares consistieron en la selección de un tipo de explanto óptimo para la obtención de callo, para ello, se utilizaron inicialmente explantos procedentes de tallo y de hoja.

Resultados y discusión

Ambos tipos, se cultivaron al medio basal MS, adicionado de diferentes concentraciones de hormonas, como auxinas: AIA (ácido indolacético), ANA (ácido naftalenacético), IBA (ácido indolbutírico) y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), y como citoquininas: KIN (quinetina) y BA (benciladenina).

Los tallos se sembraron oblicuos sobre el medio de cultivo o seccionados longitudinalmente, para incrementar la superficie de corte y de esta forma la captación de nutrientes y fueron cultivados durante 4-6 semanas, para inducir la formación de callo. Los resultados de inducción de callo a partir de tallo, figuran en la tabla 21:

Tabla 21-. Inducción de tejido de callo de *C. asiatica* a partir de segmentos de tallo después de 4 semanas de cultivo.

Reguladores del crecimiento	Nº de explantos utilizados	Nº de explantos con callo	% de inducción
AIA (2 mg/l) + KIN (0,2 mg/l)	34	21	61,8
IBA (0,1 mg/l) + BA (2 mg/l)	38	4	10,5
NAA (2 mg/l) + BA (2 mg/l)	33	24	72,7

La inducción de tejido de callo, a partir de segmentos de tallo demostró, que el tratamiento más efectivo para lograr la dediferenciación de los explantos, se conseguía con la combinación hormonal NAA y BA, pues en este caso, un 72 % de los explantos desarrollaron callo, tras cuatro semanas de cultivo en el medio de inducción. Estadísticamente, se demostró que había diferencias entre los medios utilizados (Anexo Tabla 2a-2b; P-valor=0.0000) siendo el medio adicionado con NAA (2 mg/l) + BA (2 mg/l), el que presentaba un promedio de inducción más elevado. En estos resultados, se han considerado conjuntamente los tallos sembrados de forma oblicua en el medio de cultivo y los seccionados longitudinalmente, puesto que el tipo de siembra del explanto no produjo diferencias significativas en la producción de callo.

En la Figura 52 se puede observar el aspecto del tejido de callo obtenido a partir de tallo después de 4 semanas de cultivo en el medio MS adicionado de NAA (2 mg/l) y BA (2 mg/l).

Resultados y discusión

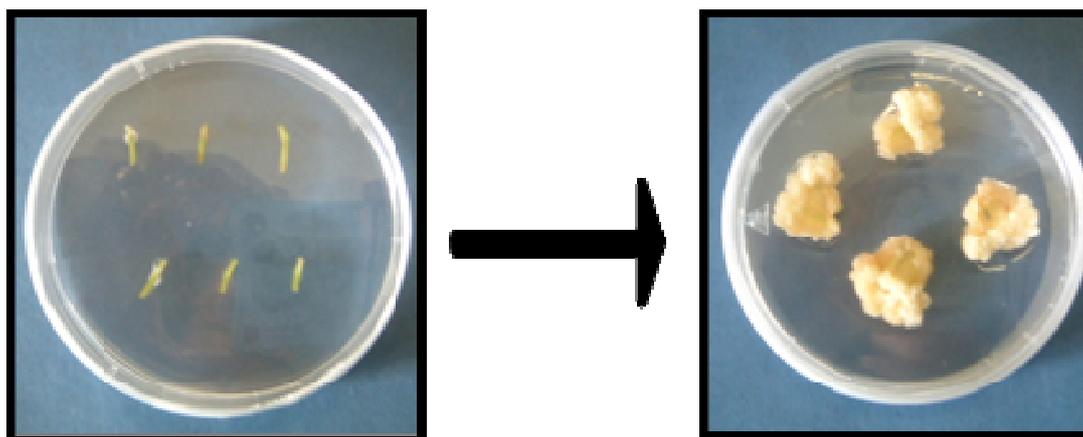


Figura 52-. Aspecto de los segmentos de tallo después de 4 semanas de cultivo en el medio para la inducción de callo que contenía NAA (2 mg/l) y BA (2 mg/l).

Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de las hojas de la planta, como fuente de explantos primarios, fueron los presentados en la tabla 22:

Tabla 22-. Inducción de tejido de callo de *C. asiatica* a partir de segmentos de hoja después de 4 semanas de cultivo.

Reguladores del crecimiento	Nº de explantos utilizados	Nº de explantos con callo	% de inducción
AIA (2 mg/l) + KIN (0,2 mg/l)	113	92	81,4
2,4-D (1mg/l) + KIN (0,1 mg/l)	72	41	56,9
IBA (0,1 mg/l) + BA (2 mg/l)	176	142	80,7
NAA (2 mg/l) + BA (2 mg/l)	53	49	92,5

Los resultados demuestran que el NAA, en combinación con BA, consiguió que un 92% de los segmentos de hoja de *C. asiatica* desarrollaran callo. Valores intermedios se obtuvieron con la adición de AIA e IBA al medio de cultivo, si bien en este caso, el análisis estadístico de los resultados demostró que las diferencias entre los tratamientos con IBA, AIA y ANA no eran significativas y que estos tratamientos constituían un grupo homogéneo. El % de inducción de callo, fue superior en hojas que en tallos, lo que nos llevó a probar un cuarto medio para hojas, con la adición de la auxina 2,4-D. Esta hormona se ha descrito como una auxina muy activa que favorece la obtención de callo friable, el objetivo de su adición era lograr un medio de inducción de material friable. Sin embargo, los resultados de la tabla 22 indican que la auxina menos activa para lograr la desdiferenciación de las células de los fragmentos de hoja de *C. asiatica* e inducir la formación de callo fue el 2,4-D a las concentraciones ensayadas, puesto que esta hormona,

Resultados y discusión

junto con la citoquinina KIN, sólo indujo la proliferación de callo en el 56,9% de los explantos sembrados, un porcentaje de inducción significativamente inferior al alcanzado con los otros tratamientos (Anexo Tabla 3a-3b; P-valor=0.0008).

Por otro lado, como en los distintos tratamientos utilizados en este experimento se ha variado la naturaleza y concentraciones de los reguladores del crecimiento de forma simultánea, nuestros resultados no permiten predecir como actuarían las diferentes hormonas a otras concentraciones o en otras combinaciones distintas a las estudiadas, en cada caso. En la figura 53 se muestra la proliferación de callo obtenido a partir de segmentos de hoja crecidos en el medio MS con NAA (2mg/l) y BA (2 mg/l), tras cuatro semanas de cultivo.

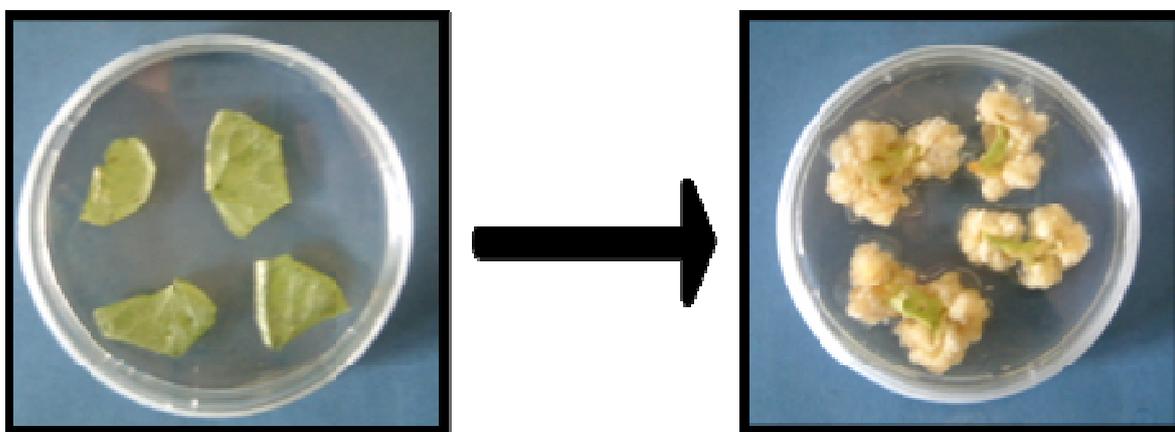


Figura 53-. Aspecto de los explantos de hoja después de 4 semanas de cultivo en el medio para la inducción de callo que contenía NAA (2 mg/l) y BA (2 mg/l).

Paramageetham y colaboradores (2004), trabajando también con *C. asiatica*, probaron distintas combinaciones de los reguladores del crecimiento (PGRs) utilizados en nuestro experimento, y llegaron a conclusiones similares. Estos investigadores encontraron que la combinación de PGRs idónea para la inducción y posterior crecimiento del callo de centella, se lograba al adicionar al medio de cultivo BA (2,85 μ M) y NAA (2,22 μ M), mientras que concentraciones de citoquininas superiores a 4 μ M inducían la producción de callo embriogénico y el desarrollo de brotes. Por otro lado, al contrario que en nuestro caso, los mismos investigadores obtuvieron buenos resultados para el crecimiento e inducción de callo, utilizando la auxina sintética 2,4-D, en combinación con las citoquininas KIN y BA.

Los tratamientos ensayados, además de afectar a la capacidad de los explantos para desarrollar callo, también afectaron a la morfología y capacidad de crecimiento del mismo. Por ejemplo, los callos cultivados en el medio con AIA y KIN crecieron poco y presentaron una

textura muy compacta, por lo que eran poco apropiados para originar suspensiones celulares mientras que en los medios con IBA y NAA los callos crecieron más y presentaron una textura algo más friable, especialmente los crecidos con IBA. Estos resultados podrían estar relacionados con las acciones intrínsecas de los diferentes PGRs y con la inestabilidad del propio AIA, que se oxida con facilidad durante el cultivo de los explantos (Slater y col., 2003).

Considerando estos resultados en su conjunto, decidimos descartar el medio que contenía 2,4-D y proseguir nuestros estudios con los medios que habían producido mejores resultados.

Por otro lado, si se comparan los valores de ambas tablas (21 y 22) nuestros resultados demuestran la idoneidad de utilizar los limbos de hoja como fuente primaria de explantos, pues en todos los medios de cultivo ensayados, este tipo de explantos fue más productivo que los segmentos de tallo para desarrollar biomasa de callo. Estos resultados podrían estar en relación con el hecho de que *C. asiatica* es una planta estolonífera que presenta los limbos de las hojas unidos a largos tallos que para mantener su rigidez, probablemente estén bastante lignificados (ver apartado 1.2.1 de la Introducción).

3.3-. Estudio de la producción de biomasa de callo de *Centella asiatica*

Como se ha mencionado en el apartado anterior, los mejores medios para la inducción de callo fueron: [MS+ IBA (0,1 mg/l) + BA (2 mg/l)] y [MS + NAA (2 mg/l) + BA (2 mg/l)], demostrándose que los medios de cultivo ensayados que contenían NAA, IAA e IBA producían un callo bastante duro y compacto, que no es idóneo, para el posterior desarrollo de suspensiones celulares, por el contrario, en el medio que contenía 2,4-D (1 mg/l) en combinación con KIN (0,1 mg/l), los callos fueron friables pero el desarrollo de los mismos fue escaso.

Una vez inducida la formación de callo, nuestro propósito fue desarrollar un sistema de cultivo óptimo para la obtención de biomasa con alta capacidad de crecimiento y a la vez, friable. Para ello, el callo se subcultivó, en los tres medios que habían dado mejores resultados para la inducción del mismo.

Como ya se ha comentado en el caso de los medios [MS + NAA (2 mg/l) + BA (2 mg/l)] y [MS + IAA (2 mg/l) + KIN (0,2 mg/l)], el callo obtenido creció relativamente poco y de manera compacta. Previamente, Patra y colaboradores (1998) habían obtenido unos resultados similares al cultivar los callos de centella en medios que contenían diferentes concentraciones de NAA y BA. Por el contrario, al utilizar el medio [MS + IBA (0,1 mg/l) + BA (2 mg/l)], un medio utilizado

Resultados y discusión

previamente por Banerjee y colaboradores (1999), para la multiplicación *in vitro* de centella, los callos crecieron más, aunque su textura tampoco fue muy friable. En nuestro experimento también se comprobó el efecto de rebajar la concentración de sales minerales del medio MS a la mitad, obteniéndose un callo más claro, mientras que el crecimiento y textura del mismo no varió significativamente.

Dado que en estos ensayos, los callos crecieron mejor con IBA que con las otras auxinas utilizadas (IAA, NAA y 2,4-D) y que nuestro propósito era obtener callo friable, en un experimento posterior, mantuvimos la concentración de auxina (IBA 0,1 mg/l) y únicamente cambiamos la citoquinina BA por una urea sustituida, la N-(2-cloro-4-piridil)-N'-fenilurea (4PU-30), a diferentes concentraciones (ver apartado 2.2 de Materiales y Métodos).

El compuesto 4PU-30, es un regulador del crecimiento vegetal que muestra una potente actividad como citoquinina, en el bioensayo de callo de tabaco (Nickell, 1986). Industrialmente se utiliza para mejorar el cultivo de la vid pues favorece el cuajado de los frutos e incrementa el tamaño de las bayas (Nickell, 1986; Dan y Lee, 2004). En cultivos *in vitro* de tabaco, provoca un mayor incremento del tamaño celular que la quinetina, promoviendo la obtención de callos friables (Piñol y col., 1987). Los conocimientos previos y el hecho de que las citoquininas derivadas de fenilurea habían sido utilizadas con éxito en cultivos de centella para inducir la formación de brotes de parte aérea (Kim y col., 2004a; Kim y col., 2005c), nos indujeron a utilizar este regulador del crecimiento en nuestros experimentos.

Con la excepción del medio [MS + IBA (0,1 mg/l) + 4-PU30 (0,2 mg/l)] en el que los callos crecieron poco y fueron muy compactos (Fig. 54), las otras concentraciones de 4PU-30 probadas (1, 2 y 3 mg/l) dieron mejores resultados y provocaron el desarrollo de callos más friables.



Figura 54.- Aspecto del tejido de callo crecido en el medio MS adicionado de IBA (0,1 mg/l) y 4PU-30 (0,2 mg/l) a la cuarta semana de cultivo.

Resultados y discusión

En las figuras 55 y 56 se muestra el efecto de estas tres concentraciones de 4PU-30 en el curso de crecimiento medido como peso fresco y seco del callo de centella durante 6 semanas. En relación con el peso fresco, los resultados obtenidos revelaron que el callo crecido en el medio [MS + IBA (0,1 mg/l) + 4PU-30 (2 mg/l)] se desarrolló bien, pero a la cuarta semana de cultivo se detuvo su crecimiento. EL mayor crecimiento del callo, medido como peso fresco, se alcanzó en el medio MS + IBA (0,1 mg/l) + 4PU-30 (3 mg/l), a la sexta semana de cultivo; además, el callo obtenido en este medio también fue el que presentó una textura más friable. El análisis estadístico de estos resultados confirmó un significativo (Anexo Tabla 4a-4b; P-valor=0.0015) incremento del crecimiento del callo inducido por la alta concentración de la citoquinina 4PU-30.

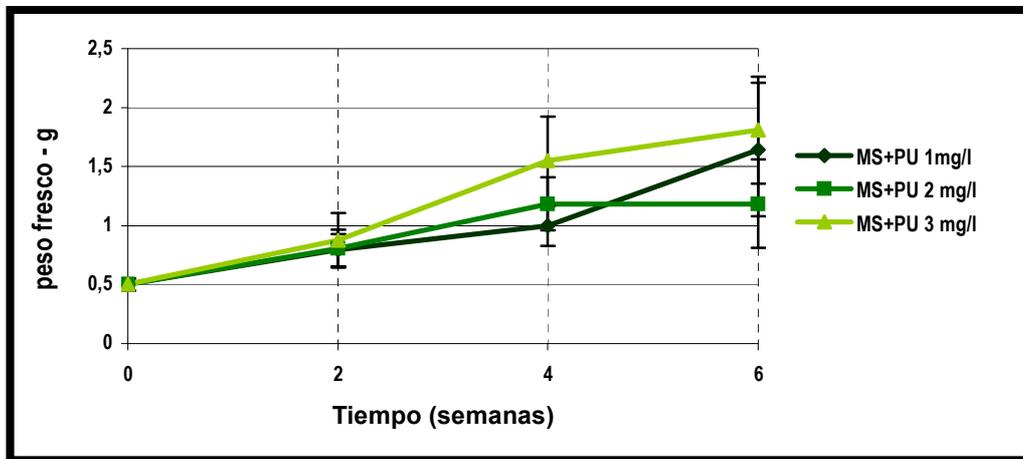


Figura 55-. Curso del crecimiento medido como peso fresco de los callos de *C. asiatica* crecidos en medio MS + IBA (0,1 mg/l) + 3 concentraciones de 4PU-30.

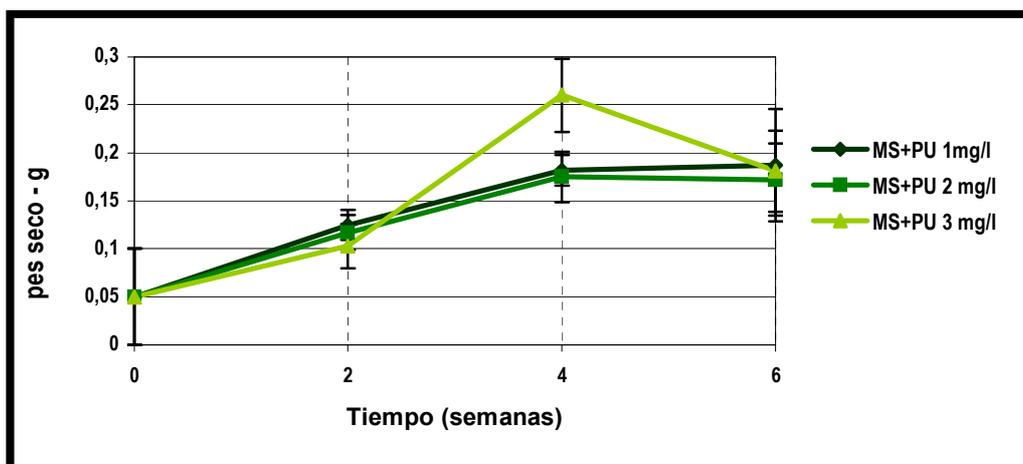


Figura 56-. Curso del crecimiento medido como peso seco de los callos de *C. asiatica* crecidos en medio MS + IBA (0,1 mg/l) + 3 concentraciones de 4PU-30.

Resultados y discusión

En general, de estos resultados se puede deducir que al aumentar la concentración de 4PU-30 en el medio de cultivo, incrementa el crecimiento del callo y este se vuelve más friable. En relación con el curso de crecimiento medido como peso seco, los resultados obtenidos mostraron que el máximo crecimiento de los callos cultivados en el medio [MS + IBA (0,1 mg/l) + 4PU-30 (3 mg/l)] se produjo a la cuarta semana de cultivo, momento en el cuál, el crecimiento medido como peso seco, fue significativamente superior al alcanzado en los medios adicionados de las concentraciones inferiores de 4PU-30 (Anexo Tabla 4). Posteriormente, el peso seco descendió de la cuarta a la sexta semana. Estos resultados podrían sugerir un agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo y evidencian que el incremento en peso fresco de estos callos durante el periodo cuarta-sexta semana, se debió principalmente a una captación de agua. Previamente (Piñol y col., 1987) se había demostrado que el 4PU-30, en relación a otras citoquininas, incrementa la captación de potasio, la toma de agua y el crecimiento en extensión celular, en tejidos de callo de tabaco. Por ello, nuestros resultados parecen sugerir que las mayores concentraciones de 4PU-30 tendrían efectos similares en callos de *C. asiatica*, activando la toma de agua de las células y de esta forma incrementarían el peso fresco del cultivo, a la vez que el callo obtenido sería más blando y también friable. En su conjunto, los resultados comentados demuestran que la fenilurea sustituida, 4PU-30, fue efectiva para obtener un óptimo desarrollo de la biomasa de callo, aunque la textura no fuera la más indicada para establecer, a partir de ella, suspensiones celulares con las que proseguir nuestras investigaciones (Fig. 57).



Figura 57.- Aspecto del tejido de callo de *C. asiatica* después de ser cultivado durante 4 semanas en medio MS adicionado con IBA (0,1 mg/l) y 4PU-30 (3 mg/l).

La falta de friabilidad del callo nos indujo a cambiar la auxina IBA por el 2,4-D, pues previamente se había descrito que esta hormona es idónea para la obtención de callos friables. La utilización conjunta de 2,4-D (2 mg/l) y 4PU-30 (3 mg/l) permitió obtener un material con una tasa de crecimiento similar a la obtenida con IBA, pero en este caso el callo era mucho más friable (ver Materiales y métodos, Fig. 26). El pase del callo a medio líquido, provocó su disgregación y la obtención de suspensiones celulares, si bien, no se lograron altas tasas de viabilidad de estos cultivos. Por ello, se cambió la citoquinina 4PU-30 por la BA a 0,1 mg/l, mejorándose

ostensiblemente la viabilidad del sistema. Este medio [2,4-D (2mg/l) + BA (0,1 mg/l)] es el que posteriormente se ha utilizado para realizar los diferentes ensayos de producción de los cultivos de células en suspensión (Fig. 58).

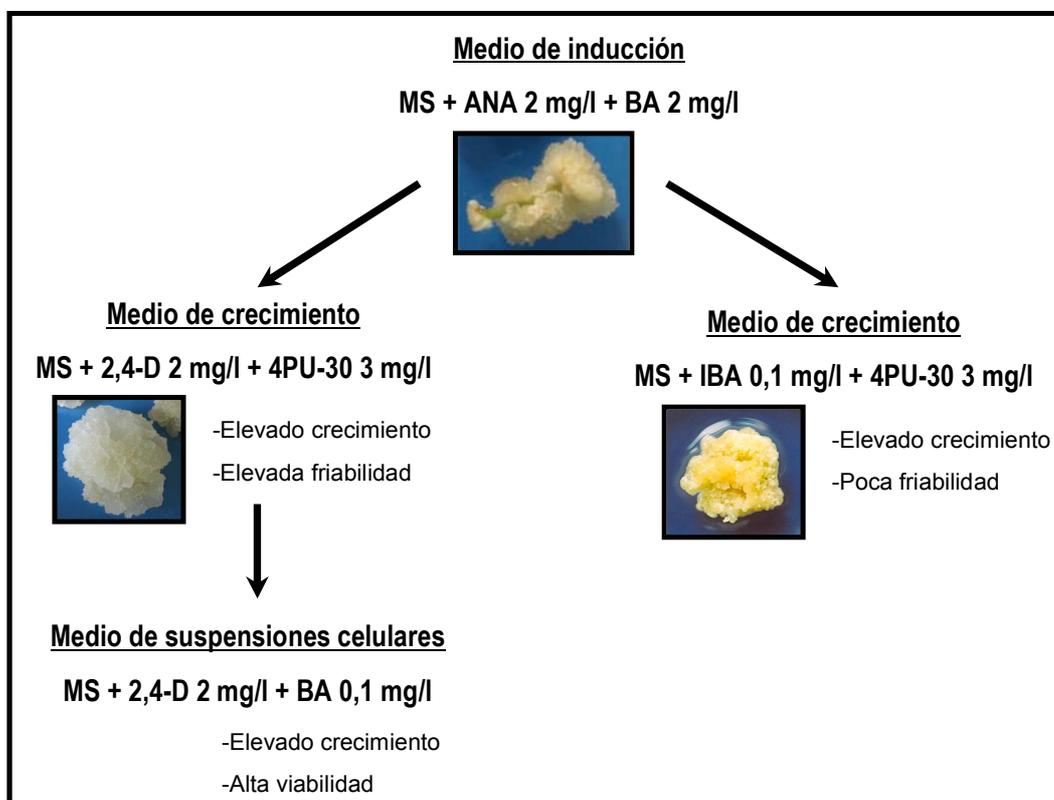


Figura 58-. Esquema de los medios utilizados para la obtención de suspensiones celulares de *C. asiatica*

3.4.-Identificación de las saponinas triterpénicas de *Centella asiatica* por TLC y espectrometría de masas

3.4.1.- Cromatografía en capa fina (TLC)

En los ensayos preliminares, se realizó el análisis cualitativo de las saponinas triterpénicas utilizando el método de TLC que sigue la Farmacopea Europea (5ª edición, 2005). Este método no permitió una buena separación de compuestos estudiados debido a la elevada presencia de sustancias que interferían, especialmente con el asiaticósido y el madecasósido, en la mitad inferior de la placa cromatográfica.

Para obtener una correcta separación de los compuestos, se ensayaron diversos solventes orgánicos, logrando que estas dos saponinas se separaran de los compuestos interferentes, y al mismo tiempo se mantuviera una adecuada resolución de los ácidos (ácido asiático, ácido madecásico).

Resultados y discusión

La fase móvil utilizada para el desarrollo de la placa estaba formada por acetato de etilo (60%) y metanol (40%).

Una vez lograda una correcta separación, se trató de optimizar la extracción de las saponinas, ya que aún se observaba en la fracción del asiaticósido y madecasósido, una acumulación de compuestos que impedía la correcta visualización de los mismos, una vez revelada la placa. Por este motivo, se probaron diferentes estrategias para eliminar las impurezas y lograr una mayor purificación de los principios activos, en el método de extracción. Así, se utilizó acetato de etilo para lograr una mayor limpieza del extracto. También se probó el hexano, pero se observó que arrastraba gran parte de la fracción ácida de los compuestos. Por ello, se decidió utilizar únicamente el acetato de etilo (Fig. 59 y 60).

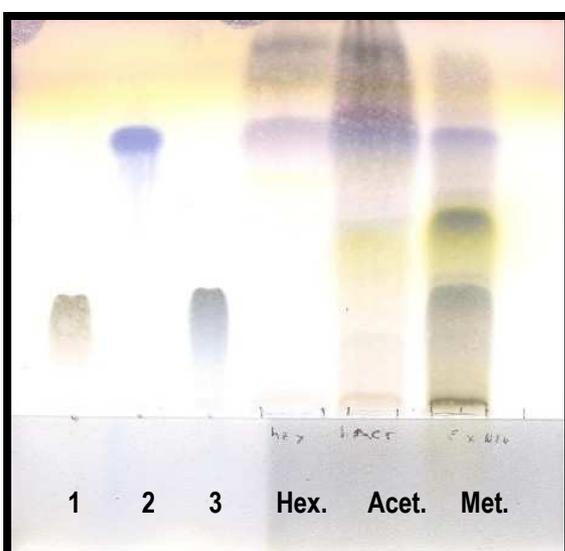


Figura 59-. Desarrollo cromatográfico de tres patrones y tres tipos de extractos vegetales (hexano, acetato de etilo y metanol).

1-.madecasósido

2-.ácido asiático

3-.asiaticósido

Hex-. Extracto hexánico

Acet-.Extracto de acetato de etilo

Met-. Extracto metanólico

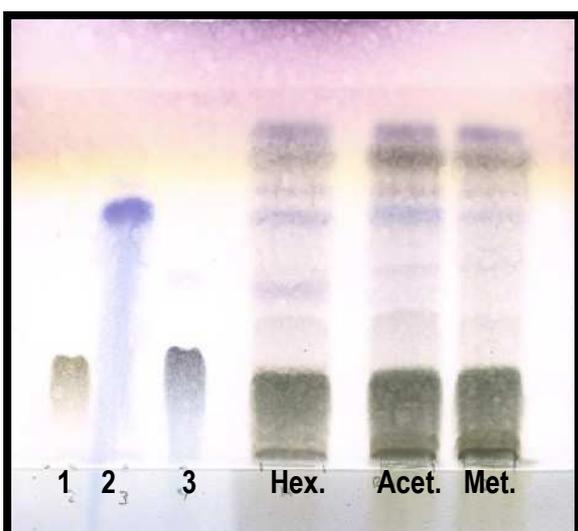


Figura 60-. Desarrollo cromatográfico de tres estándares y tres tipos de extractos de callo (hexano, acetato de etilo y metanol)

Los valores de Rf para los centelósidos identificados se muestran en la tabla 23. Se puede observar, una similitud de los Rf entre el asiaticósido y el madecasósido y entre el ácido

Resultados y discusión

madecásico y el ácido asiático. Esta similitud es debida a las características fisicoquímicas de estos compuestos, pues el madecasósido y el asiaticósido sólo se diferencian en la presencia de un grupo hidroxilo, lo que hace que la migración sea muy parecida entre ellos.

Tabla 23.- Rf de los 4 centelósidos en placas de sílica gel utilizando como disolvente acetato de etilo:metanol (60:40). Los resultados son el promedio de cinco réplicas.

Principios activos	Rf
Madecasósido	0,35
Asiaticósido	0,37
Ácido madecásico	0,88
Ácido asiático	0,90

3.4.2- Espectrometría de masas

Para confirmar la identificación de los cuatro centelósidos obtenidos por TLC, se llevó a cabo otro análisis utilizando la espectrometría de masas por el método MALDI-TOF. Las masas de los iones $[M + Na]^+$ obtenidas fueron las siguientes: 997,6, 981,6, 527,4 y 511,3 para el madecasósido, el asiaticósido, el ácido madecásico y el ácido asiático, respectivamente. (Fig. 61-65).

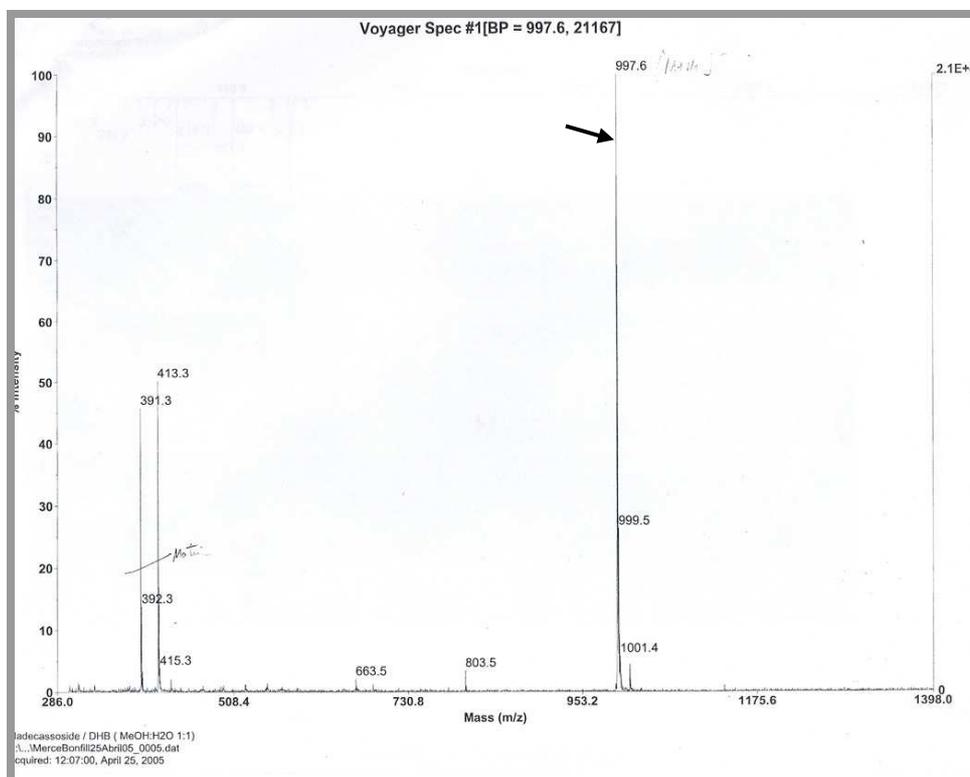


Figura 61.- Análisis MALDI-TOF: madecasósido (997,6).

Resultados y discusión

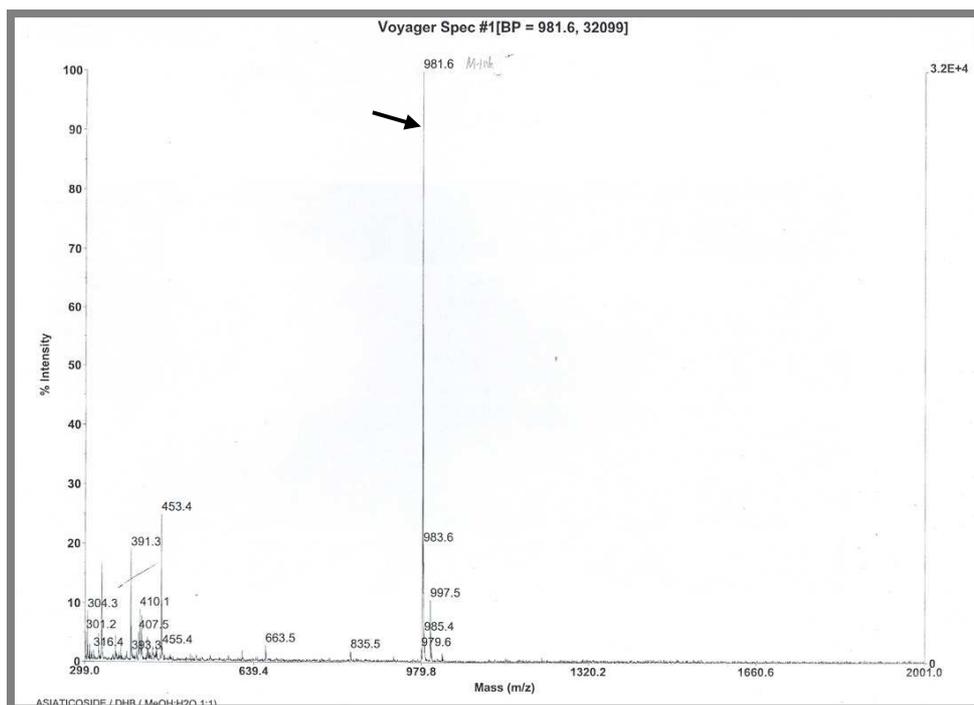


Figura 62-. Análisis MALDI-TOF del asiaticósido (981.6).

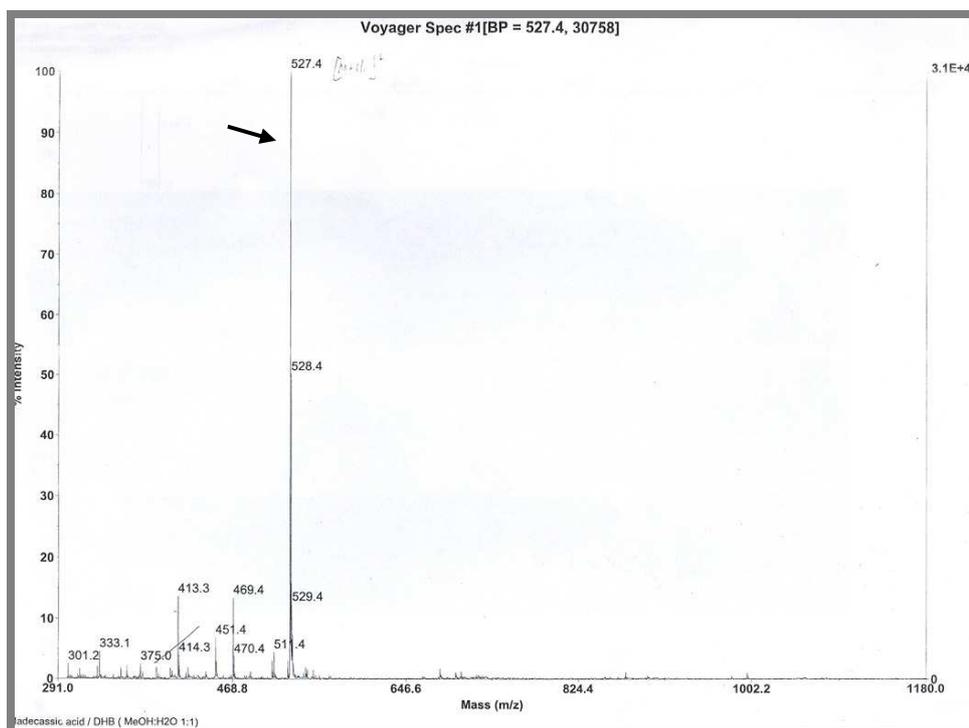


Figura 63-. Análisis MALDI-TOF del ácido madecásico (527.4).

Resultados y discusión

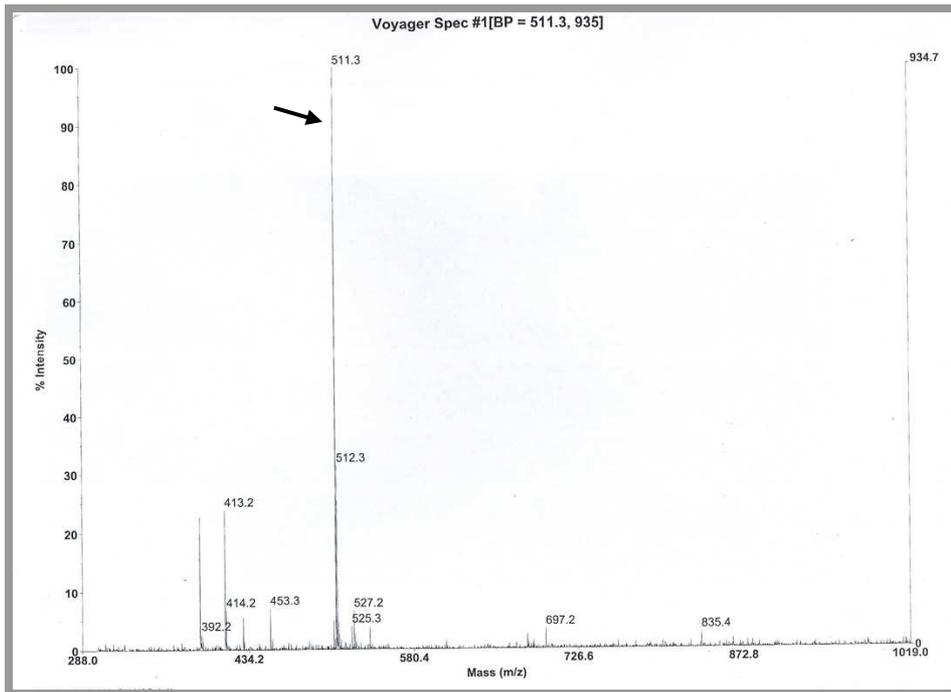


Figura 64-. Análisis MALDI-TOF del ácido asiático (511,3).

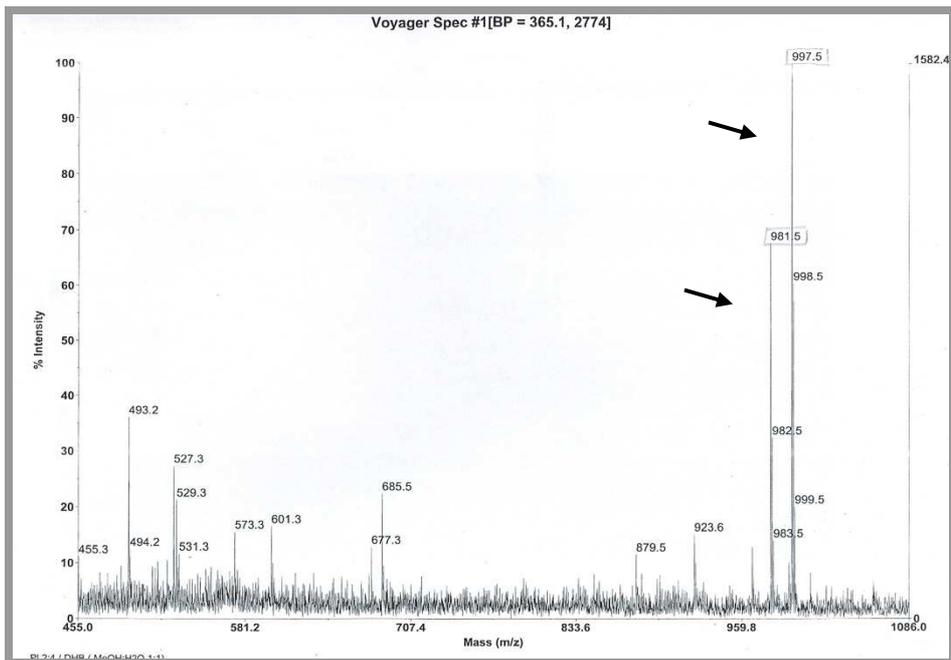


Figura 65-. Análisis MALDI-TOF correspondiente a extracto de planta de *C. asiatica*, se observan (→) las dos saponinas del extracto, el madecasósido 997.6 y el asiaticósido 981.6.

El método de TLC se puede utilizar, además, para preparar muestras antes de su análisis por HPLC. Para ello, las bandas de las placas de TLC, correspondientes a cada uno de los cuatro compuestos estudiadas, fueron rascadas y disueltas en metanol. A continuación, se filtraron y el

Resultados y discusión

filtrado se dejó evaporar. En el extracto de planta, la solución de acetato de etilo, contenía cantidades significativas de ácido asiático y ácido madecásico y por esta razón, las bandas de las placas correspondientes a estos compuestos fueron recuperadas para su posterior análisis por HPLC. Cada una de las soluciones contenía los cuatro centelósidos sin los compuestos de interferencia.

Además de la separación de los estándares, se probaron tres clases de extractos (planta, callo y un preparado farmacéutico) y la resolución de los cuatro centelósidos, en cada uno de ellos, fue suficientemente buena para poderlos utilizar en un posterior análisis por HPLC.

3.5-. Estudios de la producción *in vitro* de saponinas triterpénicas en callo de *Centella asiatica*

La cuantificación de las saponinas triterpénicas se realizó por HPLC, en las condiciones comentadas en el apartado 2.4.3.

Como ya se ha mencionado en el capítulo de Introducción, el ácido asiático, ácido madecásico, asiaticósido y madecasósido son las principales saponinas con la estructura del ursano aisladas de *Centella asiatica*, una planta que se ha utilizado tradicionalmente como antipirética, diurética y en el tratamiento de alteraciones de la piel (ver sección 1.2.3 de la Introducción). Nuestro principal objetivo ha sido el desarrollo de un protocolo para la producción de los principios bioactivos de esta planta. Estos estudios fueron realizados con *C. asiatica* var. típica y en los cultivos de callo establecidos, el triterpenoide mayoritario fue el madecasósido, seguido del ácido madecásico, asiaticósido y ácido asiático (Fig. 66).

La cuantificación de los 4 principales centelósidos de los callos se realizó a la segunda, cuarta y sexta semana del cultivo, en los medios elegidos que contenían, como ya se ha indicado, tres concentraciones diferentes de la citoquinina 4PU-30 (1, 2 y 3 mg/l). En general, el curso de producción de las saponinas triterpénicas estudiadas alcanzó su máximo a la cuarta semana del cultivo en el momento que también era máxima la producción de biomasa, pues aunque el callo continuara creciendo hasta la sexta semana, el incremento de peso se debió principalmente a la toma de agua (ver apartado 3.3). El contenido total de centelósidos medido como la suma del madecasósido, asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático en los callos cultivados en todos los medios ensayados no fue superior a 600 µg/g PS (Fig. 66).

La máxima producción de centelósidos, así como la máxima tasa de crecimiento medido como peso seco, se obtuvieron en los cultivos de callo crecidos con la concentración superior de 4PU-30 (3 mg/l), por ello, en estos cultivos la producción de saponinas se pudo relacionar

Resultados y discusión

positivamente con la producción de biomasa. Este hecho, no se da con frecuencia en la producción biotecnológica de fitofármacos, pues el metabolismo secundario de las plantas esta disociado, en la mayoría de los casos del crecimiento, y generalmente, los cultivos celulares y de órganos sintetizan estos compuestos durante la fase de crecimiento estacionario, cuando la biomasa del sistema se mantiene constante (Cusidó y col., 2002; Bonfill y col., 2003).

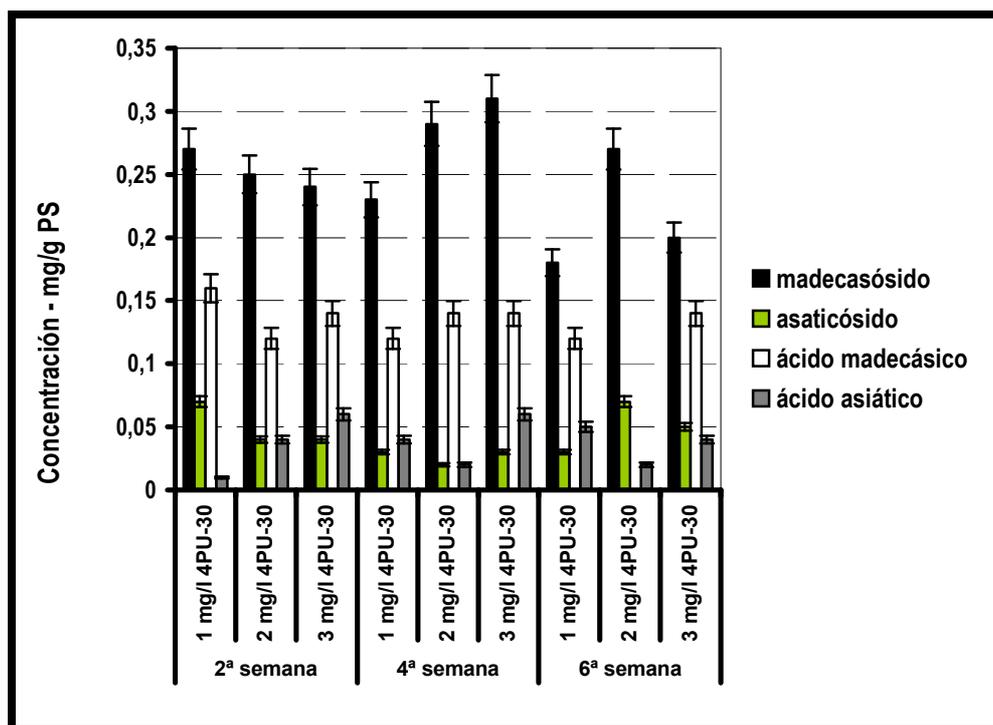


Figura 66-. Curso de la producción de saponinas triterpénicas en callo de *C. asiatica* a lo largo de 6 semanas en medio MS + IBA (0,1 mg/l) + 4PU-30 (1 – 2 – 3 mg/l).

En relación con los perfiles de producción de centelósidos, nuestros resultados muestran que la concentración de madecasósido fue aproximadamente 6-8 veces superior a la de asiaticósido y la concentración de ácido madecásico fue de aproximadamente 3 veces superior a aquella del ácido asiático (Fig. 66). En relación con las proporciones relativas de glucósidos y geninas, la cantidad de madecasósido fue del orden de dos veces superior a la de ácido madecásico, y los contenidos de asiaticósido y ácido asiático fueron similares y oscilantes a lo largo del periodo de cultivo estudiado.

Tal y como se ha indicado, el contenido total de centelósidos, medido como la suma de madecasósido, asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático, en callos crecidos en todos los medios ensayados fue inferior a 600 $\mu\text{g/g}$ PS (Fig. 67), siendo este valor más de 2 veces inferior

Resultados y discusión

al obtenido en plantas de *C. asiatica* crecidas *in vitro*. Los resultados de este ensayo, también demuestran que hubo diferencias significativas entre todos los medios probados siendo el medio con la mayor concentración de 4PU-30, el que presentó una mayor producción de centellósidos, especialmente a la cuarta semana de cultivo (Anexo tabla 5a-5b; P-valor=0.0085).

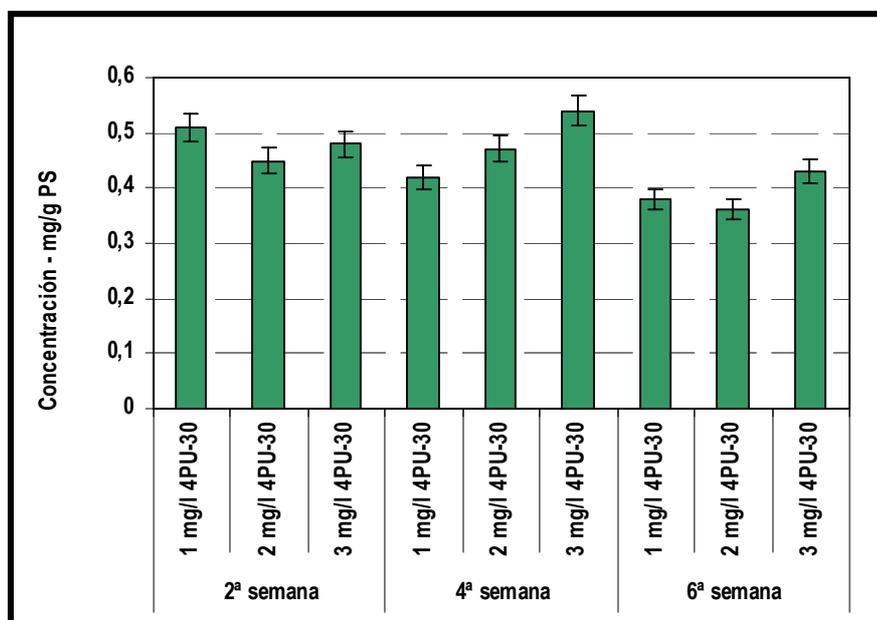


Figura 67-. Contenido total de centellósidos (madecacosido+asiaticósido+ácido madecásico+ácido asiático) de los cultivos de callo crecidos en medio MS+ IBA (0,1 mg/l) + 4PU-30 (1 – 2 – 3 mg/l).

Previamente se había demostrado que la citoquinina BA incrementa la producción de biomasa y el metabolismo secundario en cultivos celulares de *Aphelandra* (Nezbedova y col., 1999), si bien, esta citoquinina tiene escasos efectos en los cultivos celulares de *Cinchona succirubra* (Khoury y col., 1986). Teniendo en cuenta estas consideraciones, en este estudio también se determinó la producción de saponinas triterpénicas en los callos a la cuarta semana de cultivo manteniendo la auxina en el medio (IBA 0,1 mg/l) pero cambiando la citoquinina 4PU-30 por BA, ambas a la concentración de 2 mg/l (Fig. 68). Los resultados mostraron que no hay variaciones significativas en la producción de saponinas, al cambiar una citoquinina por otra, si se mantiene la misma concentración de ambos compuestos (Anexo tabla 6; P-valor=1).

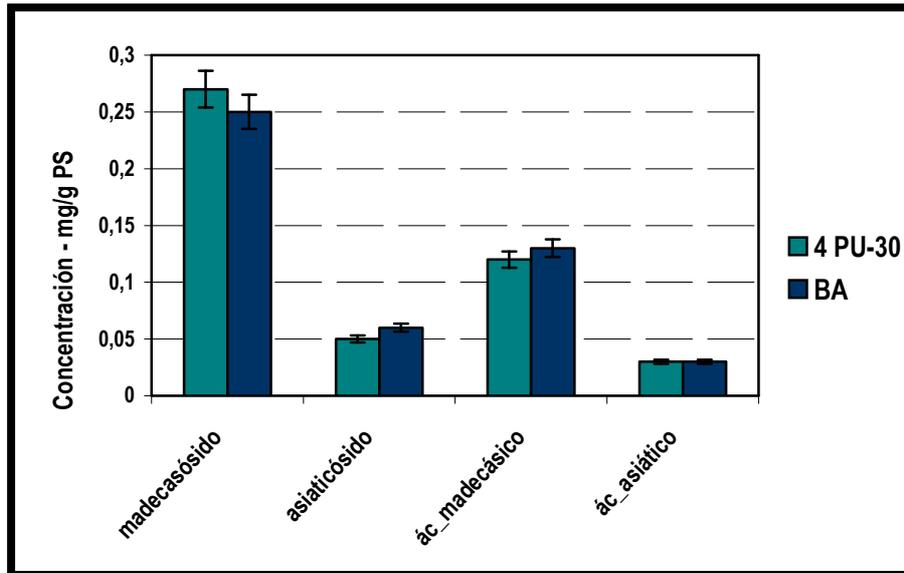


Figura 68-. Acción de las citoquininas 4PU-30 y BA a 2 mg/l sobre la concentración de los principios activos.

En conclusión, se puede resumir que el cultivo de callo de *C. asiatica* constituye una etapa previa para establecer cultivos celulares, que podrían ser utilizados en un proceso biotecnológico para incrementar la producción de principios activos de esta planta. En este trabajo, se han establecido las condiciones óptimas para obtener altas producciones de biomasa friable de callo y se ha determinado la producción de saponinas en estas condiciones. Si bien nuestros resultados muestran, en general, una escasa producción de los callos obtenidos.

Como se ha mencionado previamente, la producción de centelósidos totales en callo próxima a los 600 $\mu\text{g/g}$ PS fue inferior a la que produce normalmente la planta *in vitro*, alrededor de 1,5 mg/g PS, mientras que plantas *in vivo* pueden llegar a valores de 4,5 mg/g PS (Kim y col., 2004a); además cabe destacar que los patrones de producción de los diferentes centelósidos también variaron entre planta y callo (Fig. 69).

Resultados y discusión

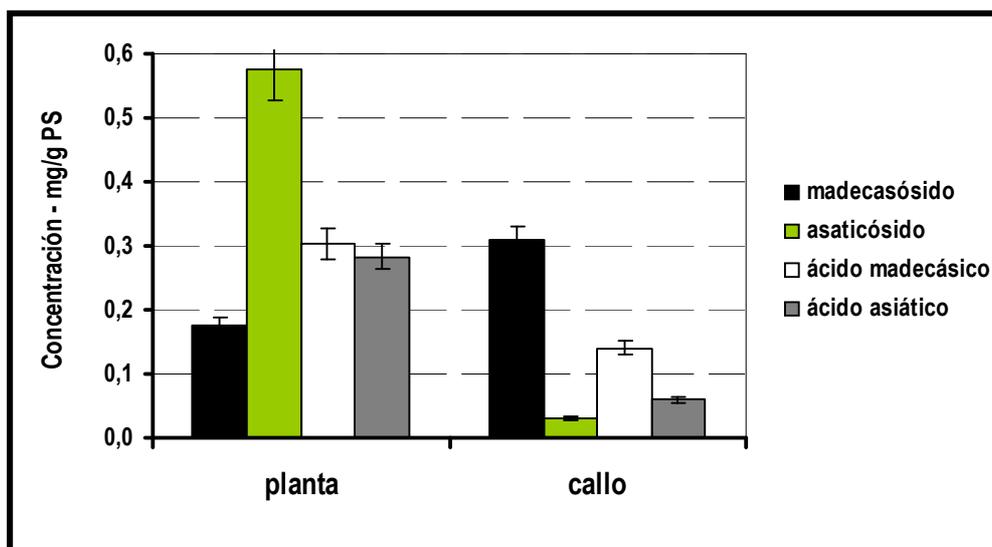


Figura 69-. Perfil del patrón de producción de los principios activos en planta y en callo.

Así, en los callos, la cantidad de madecasósido era superior a la de ácido madecásico (aproximadamente el doble), seguida por el asiaticósido y el ácido asiático, estos últimos en cantidades similares, mientras que en las hojas de las plantas el centellósido predominante era el asiaticósido, seguido por el madecasósido, el ácido asiático y el ácido madecásico. Es decir, la desorganización de los tejidos de la hoja provocó una disminución en la producción de centellósidos, afectando en mayor medida a los niveles de asiaticósido y ácido asiático, pues los contenidos de ambos compuestos se vieron drásticamente reducidos en los cultivos de callo, en relación con aquellos que presentaban las hojas (Fig. 69).

Los patrones de producción de las plantas, cualitativamente fueron similares a los obtenidos por otros autores a partir de la variedad asiática de centella (Omar y col. 2004). Los callos, en cambio, presentaron mayor cantidad de madecasósido, esto también ha sido observado previamente por otros autores, en extractos de plantas de la variedad americana (Schaneberg y col., 2003).

En los cromatogramas correspondientes a las muestras de callo, también se observó la presencia de un pico mayoritario con un tiempo de retención de 31 min, un pico que también aparecía, aunque en mucha menos proporción, en los extractos de planta (Fig. 70). Por su tiempo de retención, el pico podría corresponder a un compuesto menos polar que los centellósidos. Para identificar su naturaleza, inicialmente se realizó una separación por HPLC (ver apartado 2.4.3.1), y el eluato correspondiente al pico no identificado se derivatizó y analizó por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas.

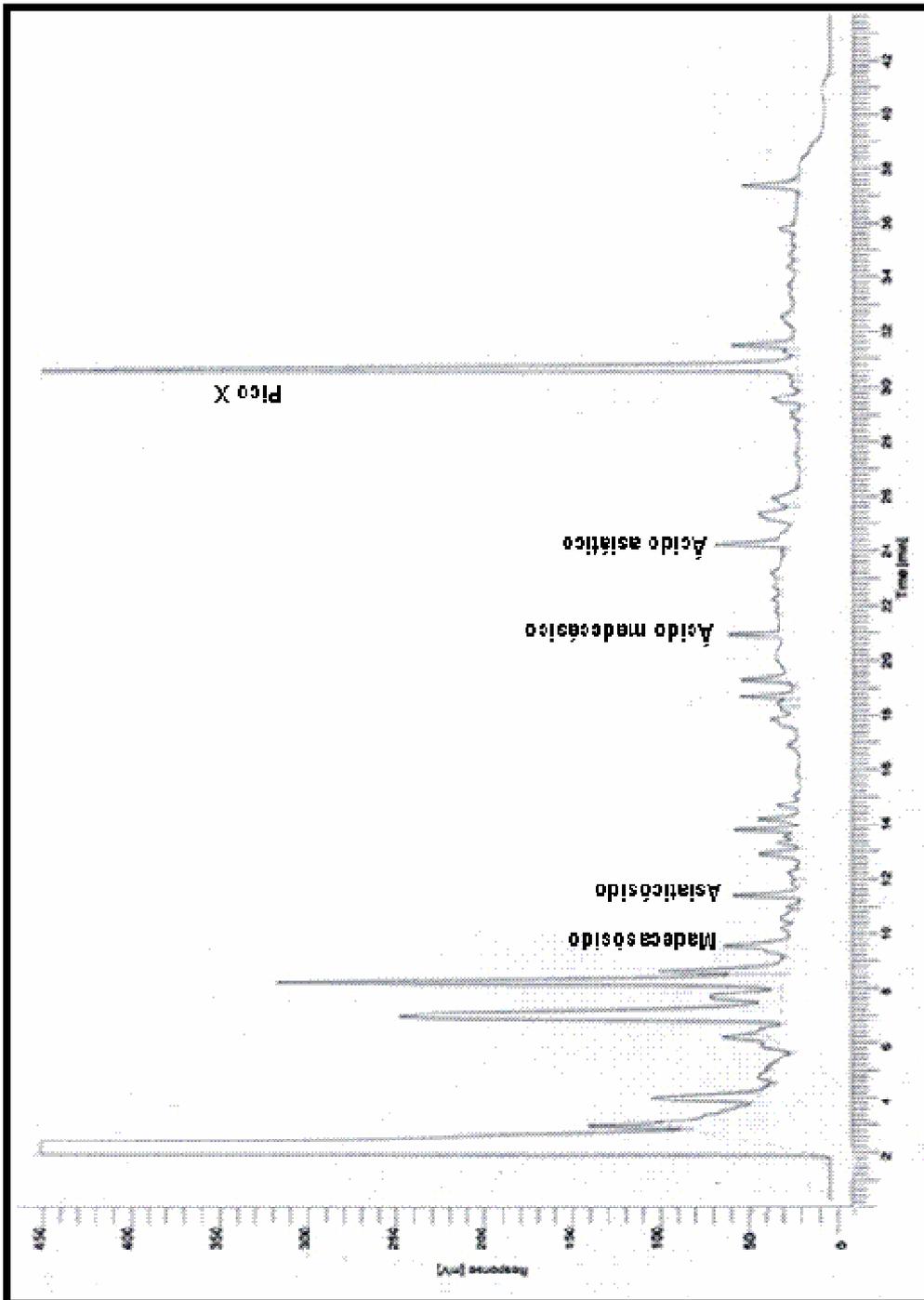


Figura 70-. Cromatograma de callo en el cual se observa la presencia del pico X.

Los análisis, entre otras cosas, mostraron la presencia de un pico de masa 213, típico de los esteranos con un doble enlace, lo cual indica que podría tratarse de un esteroide, concretamente, y por comparación entre el espectro de este compuesto con el de numerosos compuestos contenidos, en una librería de espectros, podría tratarse del acetato de β -sitosterol o el estigmastan-3,5-dieno (Fig. 71). Por el contrario no se observó ningún pico correspondiente a la

Resultados y discusión

masa de 218, característica de los derivados del ácido ursólico, cuyo núcleo poseen los centellósidos. Estos resultados descartan la aparición de un nuevo compuesto mayoritario, derivado del ácido ursólico, en los callos de centella.

Como se ha comentado en el capítulo de introducción, el primer paso específico de la biosíntesis de saponinas triterpénicas es la ciclación de 2,3-oxido de escualeno para originar, según la especie vegetal, diferentes compuestos policíclicos (Fig. 10). Las saponinas triterpénicas más comunes presentan la estructura del oleano, lupeol o del dammarano, en el caso de las saponinas de *C. asiatica*. Esta ciclación, constituye un punto de ramificación en la biosíntesis general de triterpenos en plantas, que prosigue con la formación del cicloartenol, compuesto del que derivan mayoritariamente los fitoesteroles, como son el β -sitosterol o el estigmastan-3,5-dieno. Si el 2,3-oxido de escualeno adquiere la configuración silla-bote-silla, actuaría la cicloartenol ciclasa que llevaría a la formación de fitoesteroles (Fig. 12), por el contrario, si el 2,3-oxido de escualeno adquiere la configuración silla-silla-silla podría actuar la enzima dammarenodiol sintasa que forma el catión dammaranilo (Fig. 10), un compuesto precursor de la biosíntesis de las saponinas triterpénicas de *C. asiatica* (Harampidis y col. 2002).

El que un derivado posiblemente de tipo esteroídico aparezca, como un compuesto mayoritario en los cromatogramas correspondientes a los extractos de callo de centella, y no en los de las plantas, parece sugerir que en el tejido de callo, existe una mayor actividad de cicloartenol ciclasa, la enzima que estaría retirando escualeno de su "pool" metabólico, y en consecuencia también estaría limitando la formación de saponinas en estos cultivos, pues ambas rutas metabólicas compiten por este precursor. Parece pues, que en los cultivos de callo prevalece la ruta de biosíntesis de fitoesteroles sobre la de los triterpenos pentacíclicos, mientras que en las plantas, donde este derivado esteroídico es minoritario, la actividad de la enzima dammarenodiol sintasa sería superior, y en consecuencia la producción de saponinas, aunque también es operativa cicloartenol sintasa puesto que estas plantas contienen fitoesteroles en su composición.

Posteriores estudios, comparando la producción de ambas rutas en distintas partes de la planta y analizando las actividades de algunos enzimas característicos de cada ruta o los niveles de expresión de los mismos, permitirán dar una explicación, sobre algunos de los mecanismos implicados en la regulación de la biosíntesis de centellósidos.

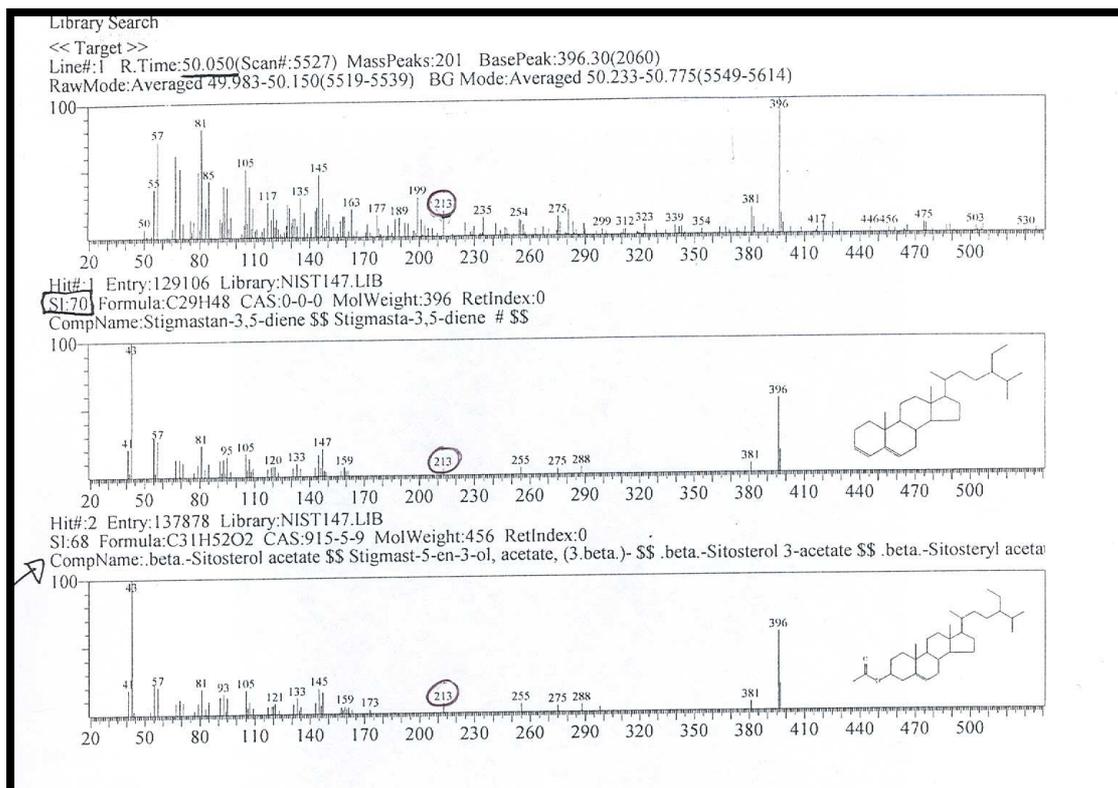


Figura 71-. Comparación entre los espectros de masas del compuesto mayoritario de los callos de *C. asiatica* (A), del estigmastan-3,5-dieno (B) y del acetato de β -sitosterol (C).

3.6.-Estudios de la producción en planta: Efecto de la elicitación con jasmonato de metilo

En la naturaleza, cuando la planta percibe un cambio en el ambiente, da lugar a una cascada de señales intracelulares. El jasmonato de metilo se ha descrito como un regulador de esta vía, que actúa activando genes implicados en los sistemas de defensa vegetales. No obstante, la adición exógena de este compuesto permite activar el metabolismo secundario, no sólo en los cultivos de plantas, sino también de los cultivos *in vitro*, por lo que puede ser utilizado como una herramienta muy efectiva para aumentar la producción. La activación está mediada por la unión del elicitor a un receptor de membrana que permite la activación de las proteínas G, éstas a la vez, desencadenan una serie de señales mediadas entre otras moléculas por fosfolipasa C, todo ello provoca el incremento de mensajeros secundarios como IP₃ o cAMP que activan las quinasas, provocando un cambio en los niveles de Ca²⁺ en el citoplasma. Una de las consecuencias de la activación de las quinasas es su fosforilación y en algunos casos la translocación hacia el núcleo, pudiendo activar la transcripción de genes que codifican para

Resultados y discusión

enzimas de las rutas biosintéticas secundarios (Vasconsuelo A. y col. 2007). Diversos estudios han demostrado una activación del metabolismo secundario, en respuesta al tratamiento con elicitores (Bonfill y col., 2003). Sin embargo, existen diversos factores que pueden hacer variar la respuesta de la planta, entre ellos están (Vasconsuelo y Boland, 2007):

- Especificidad de los elicitores: se ha observado que un mismo elicitador puede estimular el metabolismo secundario de diferentes cultivos celulares y por otro lado, ciertas plantas son capaces de responder a más de un elicitador diferente, a veces con respuestas distintas. Se ha observado que los cultivos de raíces transformadas de *Brugmansia candida* son elicitadas por compuestos tanto bióticos como abióticos, presentando diferencias en la cinética de inducción y en los niveles de hiosciamina y escopolamina, lo que indica que generalmente los metabolitos elicitados son específicos para el cultivo celular y no dependen del tipo de elicitador utilizado.
- Concentración del elicitador e intervalos del tratamiento: la concentración del elicitador es un factor que afecta considerablemente, así como, la duración del tratamiento y el estado de desarrollo de los cultivos al ser elicitados.

Kim y colaboradores (2004), demostraron que el jasmonato de metilo, incrementaba la producción de asiaticósido en cultivos *in vitro* de *C. asiatica*. Por ello, en nuestro trabajo hemos utilizado este compuesto, para estudiar con detalle como afecta a la producción de las distintas saponinas de *C. asiatica* consideradas en nuestro estudio, el asiaticósido, madecasósido, y las respectivas geninas, ácido asiático y ácido madecásico.

En los estudios de elicitación también se han analizado los niveles de esteroides, compuestos que tal como ya se ha indicado, comparten con las saponinas triterpénicas precursores en común, hasta la formación del 2,3-oxidoescualeno. El objetivo de estos análisis ha sido averiguar si existe una competencia entre ambas vías o si por el contrario los niveles de sustrato son suficientes como para abastecer a ambas, aún en caso de que alguna de ellas se viera significativamente activada, pues el MeJa no actúa de igual manera en todas las plantas.

Sin embargo, los tratamientos con jasmonato de metilo, debido a su amplia variedad de actividades biológicas, pueden tener acciones negativas en la planta, como inhibición del crecimiento, de la germinación de las semillas y del polen (McConn y Browse, 1996) o puede provocar alteraciones del aparato fotosintético (Staswick y col., 1992; Reinbothe y col., 1993; Rossato y col., 2002).

Resultados y discusión

Nuestros estudios se han realizado adicionando jasmonato de metilo a la concentración de 0,1 mM, a cultivos *in vitro* de plantas de *C. asiatica* de unos 7 cm de longitud. En este ensayo se tomaron muestras de las plantas tras 2 y 4 semanas de la adición del elicitor al medio de cultivo. Para observar los efectos del elicitor en los distintos órganos vegetales se procedió a separar la parte aérea de la planta de la raíz.

3.6.1.-Cambios morfológicos inducidos por la elicitación

Se observó una acción inhibitoria en el desarrollo vegetativo de los cultivos, en presencia del jasmonato de metilo. Las plantas tratadas mostraron una disminución general en el crecimiento, y específicamente, un necrosamiento de los ápices de las raíces (Fig. 72), tal como se habían descrito en otros trabajos, los cuales indicaban una inducción de la senescencia y una alteración del crecimiento (Weidhase y col., 1987; Kim y col., 2004a)



Figura 72-. Estudio comparativo de la morfología de una planta control (izquierda) y una tratada con jasmonato de metilo (derecha).

Numéricamente, el efecto del jasmonato de metilo se reflejó en una disminución significativa de los pesos fresco y seco del material vegetal (Tabla 24). Respecto al peso fresco se pudo observar un descenso de casi el 50% en la parte aérea (Anexo tabla 7; P-valor=0,0000). En la raíz el efecto todavía fue significativamente más acusado (P-valor=0.0000), provocando una

Resultados y discusión

disminución de casi un 70% respecto a las plantas control sin elicitar. Estos resultados, evidencian un cierto efecto tóxico del elicitor a la concentración ensayada, especialmente en la última etapa del cultivo.

Tabla 24-. Efecto del jasmonato de metilo sobre el crecimiento de la planta, medido como peso fresco y seco a las muestras a la 2 y 4 semana de cultivo.

	Semana	Control		Elicitada	
		parte área	raíz	parte área	raíz
Peso fresco	2	4,506±0,109	5,695±0,366	3,391±0,428	2,514±0,398
	4	8,083± 0,437	7,116±0,387	5,198±0,511	2,381±0,255
Peso seco	2	0,612± 0,067	0,524±0,044	0,412±0,038	0,242±0,022
	4	0,918±0,088	0,551±0,029	0,745±0,066	0,191±0,041

Previamente, Kim y col. (2004) habían ensayado el efecto de diversos elicitores sobre la producción de asiaticósido en plantas cultivadas *in vitro* de *C. asiatica*, sus resultados demostraron que de todos los elicitores ensayados, sólo el jasmonato de metilo provocaba un incremento significativo de los contenidos de asiaticósido de los cultivos. En este caso, la inhibición del crecimiento provocada por el jasmonato de metilo fue menor que la producida en nuestro experimento. Estas diferencias, podrían ser debidas al sistema de cultivo, puesto que en nuestro caso, las plantas se cultivaron en medio sólido, en frascos magenta SIGMA por lo que el elicitor era captado exclusivamente por la raíz, junto con el resto de nutrientes, lo que explicaría una mayor toxicidad sobre este órgano. Por el contrario, en el experimento de Kim las plantas de centella fueron cultivadas en biorreactores, por lo que toda la planta y no sólo la raíz estaba en contacto con el elicitor y probablemente los efectos tóxicos no se concentraron sobre este órgano.

3.6.2-. Curso de producción de centellósidos

El estudio de la producción de centellósidos, reveló diferencias significativas a nivel del contenido de principios activos entre la parte aérea y la raíz, siendo estos superiores en la parte aérea, tal y como ya se había descrito, en otros estudios previos (Kim y col., 2004a). Nuestros resultados corroboran que es la parte aérea de la planta, fundamentalmente las hojas, el lugar de acumulación de los principios activos de *C. asiatica*, además, justificarían los bajos contenidos de asiaticósido y madecasósido que presentan los cultivos de raíces transformadas de esta especie (Aziz y col., 2007).

Resultados y discusión

De los resultados de la figura 73 también se puede deducir que en la parte aérea de la planta, las concentraciones de saponinas (asiaticósido y madecasósido) fueron muy superiores a las de las respectivas geninas (ácido asiático y ácido madecásico), mientras que en la raíz los contenidos de ambos tipos de compuestos fueron similares. Los niveles relativos de centellósidos en hojas también han sido determinados en otros estudios, indicando al igual que nuestros resultados, una mayor proporción de azúcares en relación con sus geninas, independiente de los contenidos totales de centellósidos y que a su vez, estos pueden variar en función de las diferentes variedades de *C. asiatica* o por la zona de cultivo (Das y Mallick, 1991; James y col., 2008). Por el contrario, en el caso de las raíces, no existen estudios previos en los que se muestren las proporciones relativas de los diferentes centellósidos, pues en todos los estudios previos realizados con raíces, se han determinado únicamente los contenidos de asiaticósido y madecasósido (Aziz y col., 2007; Kim y col., 2007).

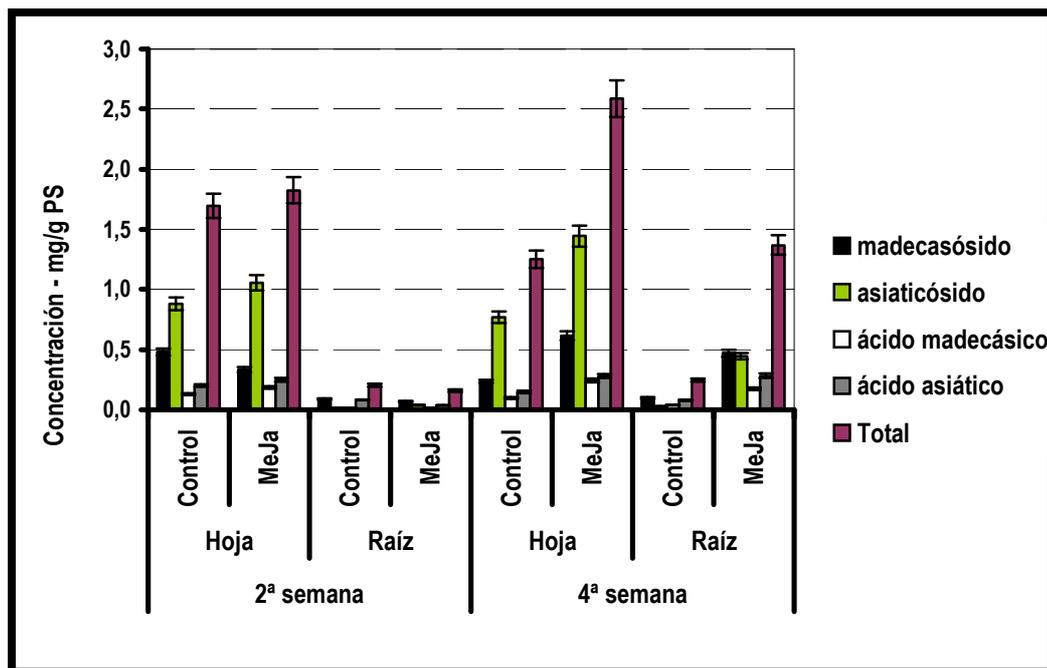


Figura 73-. Efecto de la elicitación con jasmonato de metilo sobre los contenidos de centellósidos.

Los resultados también demuestran, la acción significativamente activadora del jasmonato de metilo sobre la producción de centellósidos de los cultivos (Anexo tabla 8; P-valor=0,0004), sobre todo a nivel de parte aérea, donde los contenidos de centellósidos llegaron a duplicarse. De igual modo, nuestros resultados muestran que la acción del jasmonato de metilo sobre la biosíntesis de los principios activos, era más notable en la cuarta semana que no en la segunda, de este modo, se puede indicar que existía una diferencia de sólo un 7% en hojas en la segunda semana

Resultados y discusión

mientras que a la cuarta, la diferencia entre las plantas control y las tratadas con jasmonato de metilo fue superior al 50%. En raíz, las diferencias también fueron significativas, representado un incremento de un 2% en la segunda semana, y en la cuarta un incremento de hasta un 80%. En relación a las distintas saponinas, el jasmonato de metilo provocó, en general, un aumento medio del 50% en la producción de cada componente, sin variar el patrón de los centellósidos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en experimentos previos realizados en plantas (Kim y col., 2004a) y cultivos de raíces transformadas (Kim y col., 2007), pues en ambos casos se observó un efecto activador del jasmonato de metilo sobre la producción de asiaticósido.

3.6.3-. Niveles de fitoesteroles

En cuanto a los niveles de fitoesteroles, nuestros resultados demuestran que no existió una variación significativa de las proporciones de los diferentes compuestos estudiados a lo largo del cultivo (Fig. 74). En todos los casos los contenidos de estigmasterol + campesterol fueron significativamente superiores (Anexo tabla 9) a los de sitosterol seguidos de los de colesterol, tanto en la parte aérea, como en raíces. La presencia de colesterol se redujo a trazas, debido a que en plantas, este compuesto no está entre los fitoesteroles más abundantes y principalmente es utilizado como precursor de otros metabolitos (Gil, 2002).

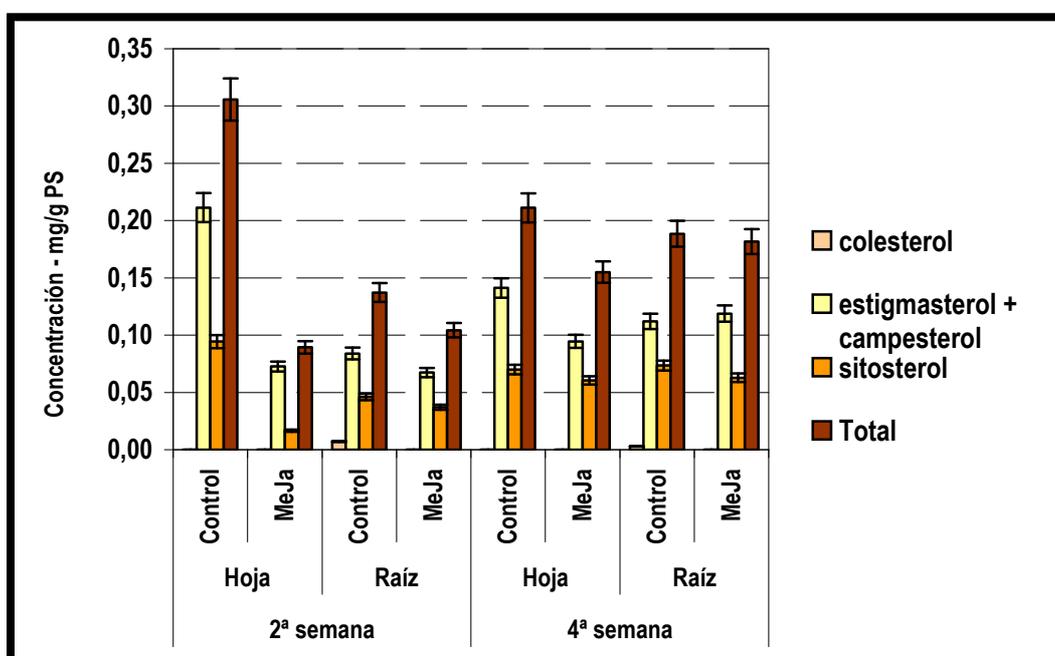


Figura 74-. Estudio comparativo de los niveles de fitoesteroles de plantas de *C. asiatica* control y tratadas con jasmonato de metilo.

El contenido total de fitoesteroles (expresado por la suma de sitosterol + campesterol + estigmasterol + colesterol) resultó siempre significativamente superior (Anexo tabla 9B2; P-valor=0.000) en la parte aérea que en la raíz, independientemente si la planta hubiera sido o no tratado con el elicitor. La presencia del jasmonato de metilo en el cultivo redujo también significativamente (Anexo tabla 9B3; P-valor=0.000) los niveles de fitoesteroles respecto del control, tanto en la parte aérea como en la raíz. Como se ha indicado previamente (ver apartado 1.2.2.2 de introducción), centelósidos y fitoesteroles compiten por un precursor común el oxido de escualeno, por ello, nuestros resultados parecen sugerir, que el jasmonato de metilo activaría la biosíntesis de centelósidos, en pasos posteriores a la formación del 2,3-oxido de escualeno, y en consecuencia, los incrementos de centelósidos se obtendrían a expensas de parte del escualeno que en las plantas control se dirigiría a la formación de fitoesteroles, aunque esta hipótesis requiere más experimentos para su comprobación.

3.7-. Estudio comparativo de la producción de centelósidos y fitoesteroles en plantas y callos

Los resultados obtenidos en los apartados 3.5 y 3.6, nos han permitido realizar un estudio comparativo de los contenidos de centelósidos y fitoesteroles determinados en los órganos de la planta para compararlos con aquellos obtenidos en un material no diferenciado como es el callo de *C. asiatica*. Los resultados de este estudio comparativo revelaron que la organización celular cambia el perfil de centelósidos del material vegetal, ya que como puede apreciarse en la Fig. 75, mientras que en los cultivos indiferenciados de callo, el centelósido mayoritario fue el madecasósido, seguido de su genina el ácido madecásico, el asiaticósido y finalmente el ácido madecásico, en la parte aérea de la planta, el compuesto mayoritario fue el asiaticósido, seguido del madecasósido y finalmente las geninas ácido madecásico y asiático. A nivel de raíz, nuevamente se vio alterado el perfil de centelósidos y al igual que en el callo, la saponina mayoritaria fue el madecasósido.

Resultados y discusión

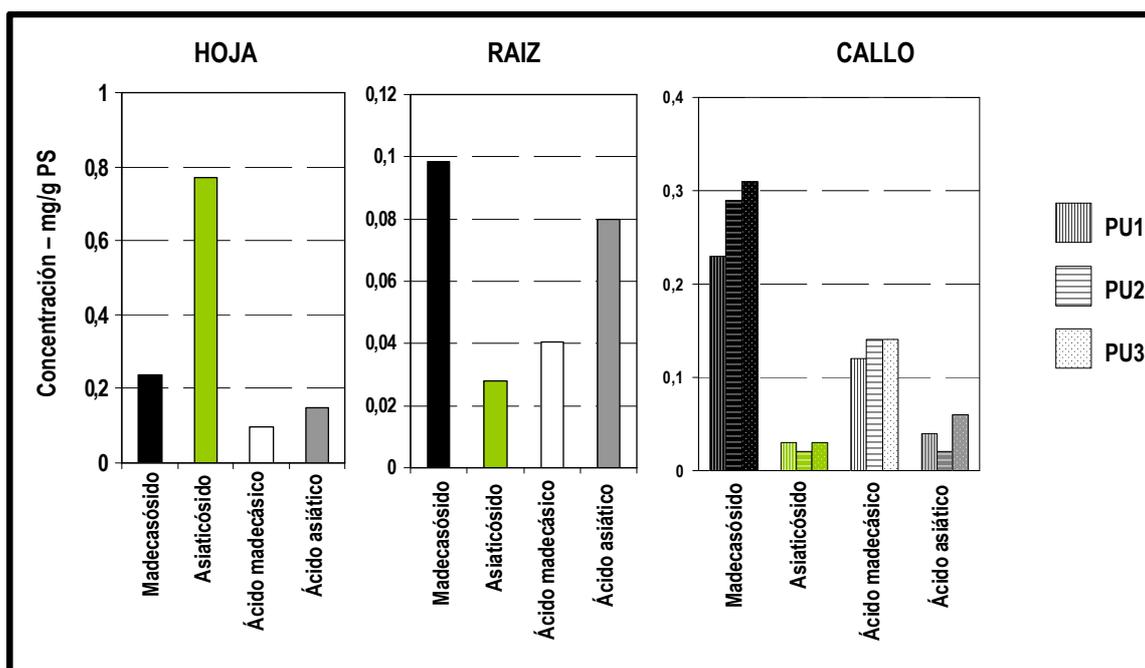


Figura 75-. Estudio comparativo de los niveles de saponinas y sapogeninas (Concentración – mg/g PS) de *C. asiatica*, en hojas, raíz y en callo suplementado con IBA (0,1 mg/l) y 4PU-30: 3 mg/l a la 4ª semana de cultivo (A: madecasósido, B: asiaticósido; C: ácido madecásico y D: ácido asiático).

En todos los materiales analizados, los niveles de saponinas fueron significativamente superiores a los de las sumas de sus respectivas geninas. También la organización tisular varió los contenidos totales de centelósidos, que en callo no superaron los 0,6 mg/g PS, mientras que en planta *in vitro* se alcanzaron niveles superiores a 1,5 mg/g PS.

En otros trabajos, en los que se ha comparado la composición de centelósidos en plantas y suspensiones celulares de dos variedades de *Centella asiatica* de Sudáfrica, se observó una variación del patrón de centelósidos entre las plantas y los cultivos, no organizados. Resultando una mayor presencia de asiaticósido en planta que de madecasósido, mientras que en los cultivos celulares, era al revés, una mayor presencia de madecasósido (James y col., 2008).

En relación con los contenidos de esteroides (Fig. 76), nuestros resultados también demuestran que la organización tisular es un factor que puede condicionar los niveles de esteroides libres de los cultivos, ya que los mayores contenidos de fitoesteroides, aproximadamente de unos 330 $\mu\text{g/g}$ PS, se observaron en hojas, mientras que en callos los máximos niveles obtenidos fueron de 170 $\mu\text{g/g}$ PS, detectados en los callos crecidos durante cuatro semanas, con la concentración más

Resultados y discusión

alta de hormona (3 mg/l 4PU-30). En su conjunto, esta diferencia en la producción de centelósidos y fitoesteroides observada entre las plantas y los cultivos de callo podrían deberse a una menor expresión, en estos últimos, de las enzimas implicadas en la biosíntesis de triterpenos que operan de forma común en ambas vías metabólicas, aunque se requieren nuevos estudios a nivel molecular para confirmar esta hipótesis.

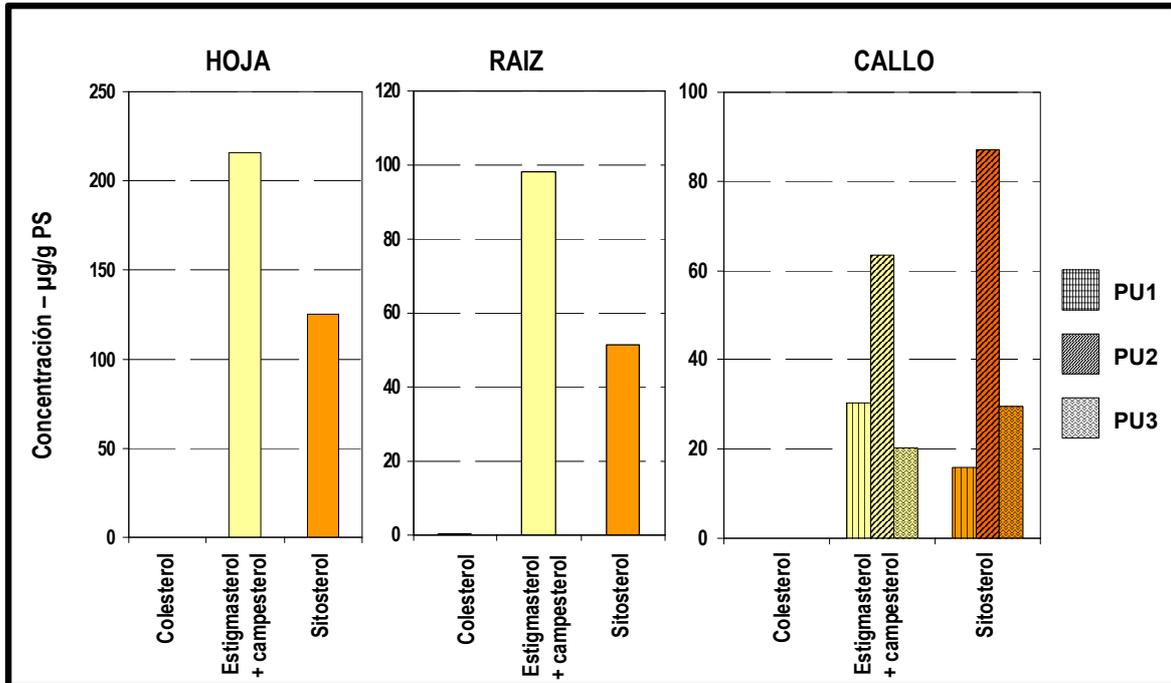


Figura 76-. Estudio comparativo de los niveles de fitoesteroides, en hoja, raíz y en callo suplementado con IBA (0,1 mg/l) y 4PU-30: 1 mg/l (PU1), 2 mg/l (PU2) y 3 mg/l (PU3), a la 4ª semana de cultivo.

3.8-. Análisis a nivel génico de la producción saponinas y fitoesteroides

3.8.1-. Selección del “housekeeping”

El análisis de la expresión genética es importante para entender los complejos mecanismos de regulación e identificar los genes clave, en los procesos biológicos. Diferentes técnicas son usadas para determinar la expresión de genes cuantitativamente, pero todas ellas necesitan en su procesamiento de un control interno (housekeeping). Este control interno, permite comparar las diferencias entre las muestras analizadas, ya que, como control tienen que presentar una expresión basal constante, no estar regulados, ser independientes del ciclo y del estado de desarrollo, y no responder a tratamientos externos. De esta manera, se asegura que las

Resultados y discusión

diferencias observadas en las muestras son debidas a las diferencias de expresión de los genes provocadas por los distintos tratamientos.

Como control interno elegimos el 5,8S rRNA, un componente de la subunidad grande de los ribosomas en eucariotas (Fig. 77). Este rRNA esta implicado en la translocación ribosomal y es transcrito por la RNA polimerasa I, como parte del precursor 45S, que a la vez contiene la subunidad 18S y 28S de rRNA (Elela y Nazar, 1997).

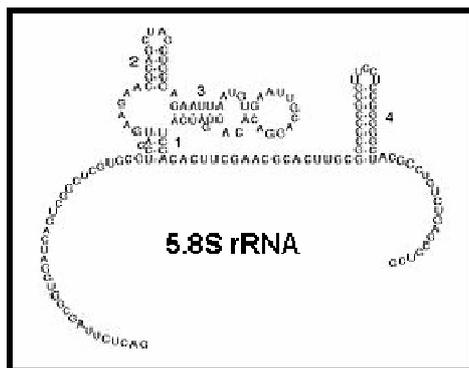


Figura 77-. Estructura secundaria del 5,8S rRNA.

Las ventajas de utilizar RNA ribosómico como control interno, se han demostrado en diferentes trabajos, en los que se ha comprobado que los niveles de rRNA tienden menos a variar, bajo condiciones que afecten al mRNA (Goncalves y col., 2005). En otro estudio en el que se comparaba la expresión de 18S rRNA con diferentes controles internos (GAPDH, actina, tubulina), en plantas de arroz sometidas a radicales UV, se demostró, que el único gen que presentaba los mismos niveles de expresión era el 18S RNA. Diferentes estudios han demostrado la fiabilidad de utilizar rRNA como control interno (Singh y col., 2004).

El primer paso en la puesta a punto de la técnica de RT-PCR fue determinar el ciclo optimo de amplificación de las muestras, de manera que el producto obtenido de la PCR estuviera dentro de la fase exponencial (Singh y col., 2004). La curva de amplificación presenta generalmente tres fases:

- 1) fase de latencia (*lag*), donde la acumulación de producto no se puede detectar
- 2) fase exponencial
- 3) fase de saturación, en la cual no se puede medir la diferencias de intensidad de las muestras.

Se probaron 25, 28 y 30 ciclos, seleccionando 28 ciclos, como los necesarios para amplificar y cuantificar correctamente el material genético. Por otro lado, para validar el control interno se realizó la misma PCR pero con volúmenes diferentes, 0,5, 1 y 1,5 μ l, los cuales aumentarían

Resultados y discusión

proporcionalmente, demostrando así que el gen candidato tiene expresión basal constante y no variable en función de la cantidad de DNA. Los resultados obtenidos demostraron que no existían, diferencias significativas (Anexo tabla 10; P-valor>0,05 en cada volumen) entre las muestras, en cada volumen, lo que permitió usar el 5,8S como control interno, bajo nuestras condiciones de experimento (Fig. 78).

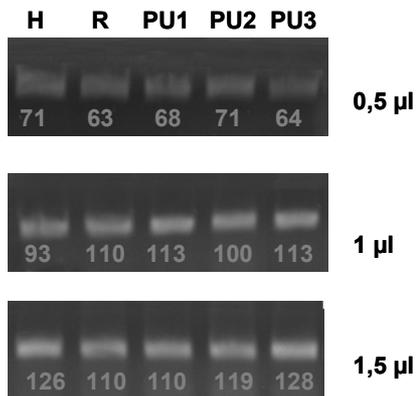


Figura 78-. Amplificación del gen 5,8S rRNA, en el que se indica en cada línea los microlitros usados en cada PCR y los valores del interior de cada figura representan la intensidad de cada amplificación de las muestras utilizadas (H: hoja; R: raíz; y en diferentes callos crecidos en medio MS + BA 0,1 mg/l + 4PU-30: 1 mg/l (PU1); + 2 mg/l (PU2) y + 3 mg/l (PU3)).

3.8.2-. Análisis por RT-PCR

Después de extraer el RNA del material vegetal, tanto de planta como de callo, y pasarlo a cDNA se procedió a realizar las diferentes PCR's con los genes de interés.

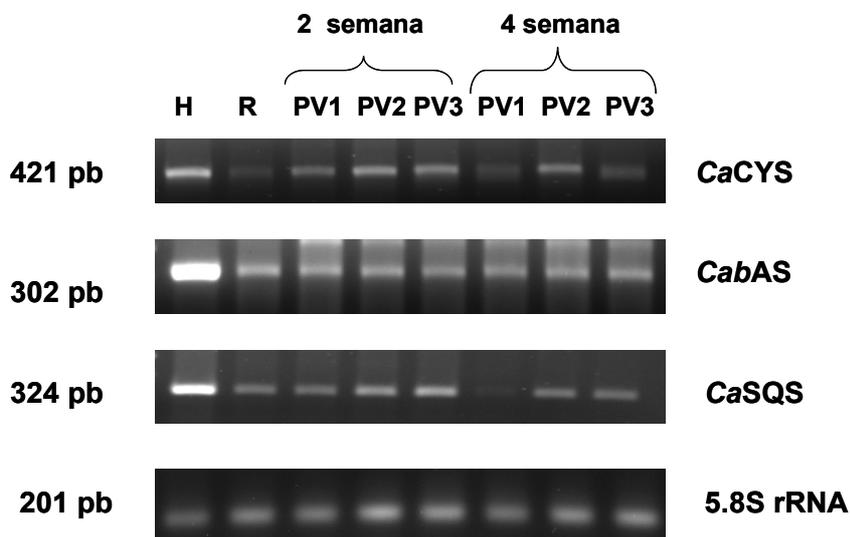


Figura 79-. Expresión de la cicloartenol sintasa (CaCYS), escualeno sintasa (CaSQS) y la β -amirina sintasa (CabAS) en diferentes órganos de la planta (H: hoja y R: raíz) y material desdiferenciado crecido en un medio MS con IBA (0,1 mg/l) con 4PU-30: 1 mg/l (PU1), 2 mg/l (PU2) y 3 mg/l (PU3).

La comparación del nivel de expresión de los tres genes de interés (Fig. 79) con los niveles de producción de saponinas de los cultivos de callo crecidos con 3 concentraciones diferentes de la

Resultados y discusión

citoquinina 4PU-30 (Fig. 67) revela que, el nivel de expresión de los tres genes investigados en los cultivos de callo era bajo, al igual que los contenidos de centelósidos, mientras que en las hojas existía mayor expresión de *CabAS* y *CaCYC* a la vez que una mayor producción de saponinas triterpénicas y fitoesteroles.

Por otra parte, los niveles de expresión de *CabAS* fueron similares en raíz y en los diferentes cultivos de callo, mientras que la producción era ligeramente más elevada en los callos que en la raíz.

Estos resultados indican que la baja producción de saponinas en callos, podría explicarse por la baja expresión del gen de la escualeno sintasa (*CaSQS*), esta enzima genera un precursor común para la vía de los esteroides y de las saponinas triterpénicas, lo que implicaría que tuviera un papel clave en la regulación de la síntesis de los centelósidos.

3.9-. Producción de centelósidos en los cultivos de células en suspensión

La producción de metabolitos secundarios con actividad biológica mediante suspensiones celulares, supone una fuente de valiosos productos, renovable y respetuosa con el medio ambiente, y a la vez, desde el punto de vista de procesamiento, permite un mejor control de las condiciones de producción. Las suspensiones celulares se inician a partir de un explanto que es transferido a un medio nutritivo, con una determinada concentración de reguladores del crecimiento, provocando inicialmente la proliferación de células indiferenciadas que constituyen el callo. Los cultivos de callo, posteriormente se transfieren a un medio líquido obteniendo las suspensiones celulares. Estas células, al considerarlas como totipotentes pueden ser utilizadas como sistemas de regeneración de toda la planta, sin embargo, hay evidencias que sugieren que la mayoría de cultivos pierden la capacidad de regenerar planta, a medida que pasa el tiempo. Se conoce poco sobre el estado de desarrollo de las células a lo largo del tiempo de cultivo, lo cual, es un punto a tener en cuenta cuando se usan suspensiones celulares durante largos periodos de tiempo, para la producción de fitofármacos (Kolewe y col., 2008).

En procesos biotecnológicos, la obtención de suspensiones celulares representa un paso previo para el escalado en biorreactores. En estos cultivos se optimizan, el sistema de producción, en el que se busca un elevado rendimiento y productividad del compuesto de interés, comparado con la planta entera, de manera que económicamente resulte rentable. La producción biotecnológica sólo puede ser abordada para compuestos de alto valor añadido, con un precio en el mercado superior a los 1000 US\$/Kg ya que el último paso, el cultivo en

Resultados y discusión

biorreactores, encarece mucho el sistema, pues, mientras que las células microbianas presenta unas características similares y se cultivan en biorreactores con características comerciales parecidas, en vegetales se ha observado, que las necesidades de cada especie son diferentes y en la mayoría de los casos, se requieren modificaciones de los diseños comerciales, para adaptarlos a cada proceso (Rao y Ravishankar, 2002) (Tabla 25).

Tabla 25-. Diferencias entre cultivos microbianos y células vegetales y dificultades que plantea el escalado en biorreactor de las suspensiones celulares.

Caracterización	Células microbianas	Células vegetales	Consecuencias para cultivos a gran escala
Tamaño y morfología	Células Individuales 2-10 μm	Agregados de 10-200 μm y de hasta 2 mm de diámetro	Sedimentación rápida; formación de gradientes; dificultad para tomar muestras
Velocidad de crecimiento	Rápida; td ~ 1-2 h	Lenta; td ~ 2-5 días	Largos tiempos de proceso; baja productividad
Densidad de inoculación	Pequeña	5-20%	Necesidad de grandes cantidades de inóculo; escalado más largo
Acumulación del producto	Extracelular	Intracelular / a veces extracelular	Permeabilización; remoción <i>in situ</i>

Td: tiempo de duplicación.

3.9.1-. Estudio del crecimiento y la producción de centelósidos, en suspensiones celulares de *Centella asiatica*

Para obtener las suspensiones celulares de *C. asiatica*, 20 g de callos friables obtenidos, según se describe en el apartado 2.3 de Materiales y Métodos, fueron transferidos a erlermeyers con 200 ml de medio MS líquido, adicionado de 2,4-D 2 mg/l y BA 0,1 mg/l y cultivados en agitación para su disgregación. Posteriormente los cultivos se filtraron para separar los agregados celulares de las células aisladas. Una vez obtenidos los cultivos celulares de *C. asiatica*, el primer objetivo fue estudiar su capacidad para producir biomasa y los metabolitos secundarios considerados. El estudio, se realizó durante 30 días, tomándose muestras cada 5 días para determinar la viabilidad de los cultivos, su peso fresco, peso seco y los contenidos de centelósidos y fitoesteroles.

El estudio de la viabilidad, determinada siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.2 de Material y Métodos, reveló un progresivo descenso de este parámetro a partir del día

Resultados y discusión

20, pasando de valores del 80% de células vivas a un 43% al final del periodo de cultivo estudiado, es decir en los últimos 10 días de cultivo la viabilidad se redujo a la mitad (Fig. 80).

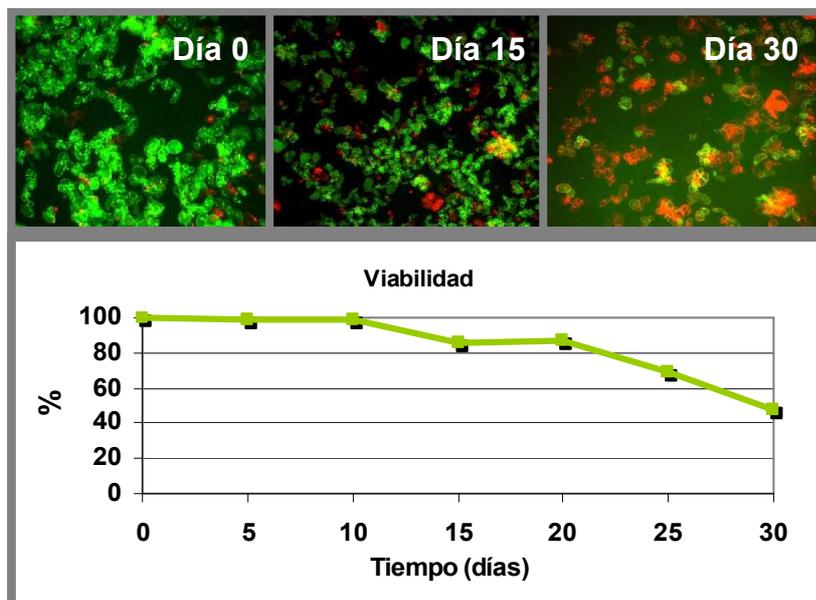


Figura 80-. Curso de viabilidad celular durante los 30 días de cultivo. En la parte superior de la figura se observan células marcadas con IP (rojo) y con DAF (verde) permitiendo ver el aumento progresivo de la mortalidad celular a medida que transcurre el tiempo de experimentación.

Las muestras se liofilizaron durante 48h – 72 h, para obtener los pesos secos y de este modo analizar el crecimiento de las células, a lo largo del tiempo. Los valores de la figura 81 indican que a los 10 días de cultivo, se había triplicado el crecimiento celular medido como peso seco, manteniéndose en valores similares hasta el día 25, momento a partir del cual se produjo una drástica reducción del peso seco. Este tipo de curvas de crecimiento son características de los cultivos celulares, en las que se manifiestan claramente las fases de crecimiento lineal, en nuestro caso hasta el día 10 del cultivo, la fase estacionaria donde el peso seco se mantiene y la fase de senescencia, donde se produce una disminución considerable del peso seco, debido probablemente a la disminución de la viabilidad celular.

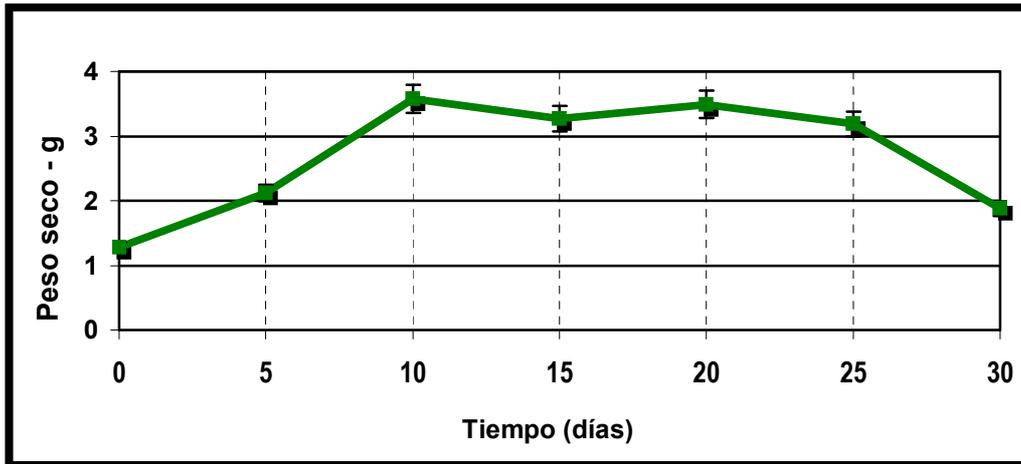


Figura 81-. Curso del peso seco de las suspensiones celulares de *Centella asiatica*.

El análisis de la producción de centelósidos, reveló diferencias significativas en el tiempo (Anexo tabla 11; P-valor=0.000) mostrando una mayor producción durante el final de la fase de crecimiento estacionario (días 20-25), para disminuir posteriormente hasta el día 30 en que se concluyó el experimento (Fig. 82). Este tipo de curso de producción, es frecuente en los estudios sobre el metabolismo secundario, puesto que se considera, que durante la primera fase del cultivo, la fase de crecimiento lineal, el flujo de carbono va dirigido principalmente hacia la producción de metabolitos primarios, y sólo cuando disminuye la tasa de duplicación celular se activan las vías metabólicas secundarias, que en nuestro caso, llevarían al acúmulo de centelósidos. En cuanto al patrón de producción, los contenidos relativos de centelósidos de la suspensión celular fueron similares a los que presentaban los callos de esta especie vegetal (Fig. 66), mayor presencia de madecasósido y ácido madecásico que de asiaticósido y ácido asiático, si bien, en este caso y mayoritariamente, ambas geninas se presentaron en menor proporción que los respectivos glucósidos.

Resultados y discusión

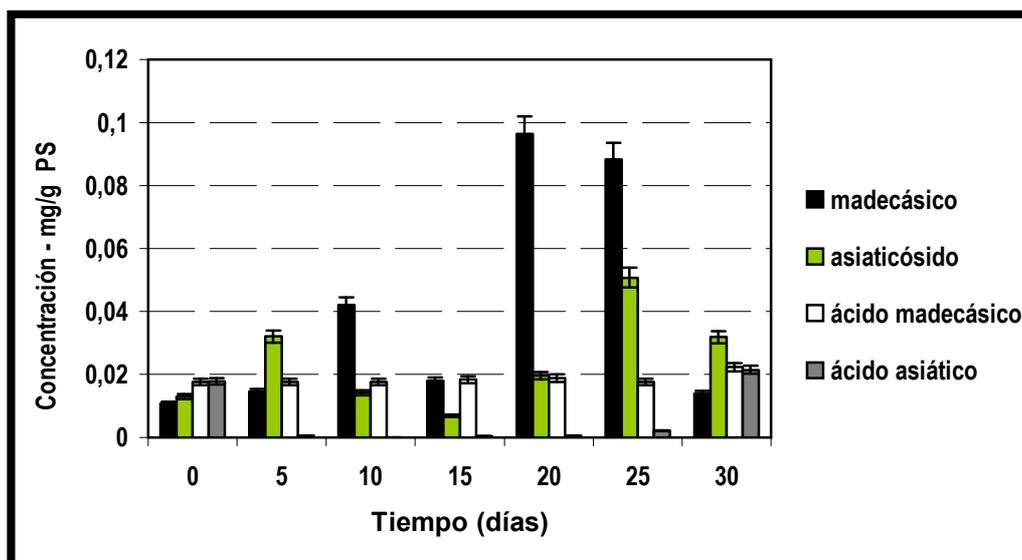


Figura 82-. Curso de la producción de centelósidos en las suspensiones celulares.

3.9.2.- Optimización de la producción mediante la utilización de reguladores del crecimiento

Uno de los sistemas para la mejorar la producción de las suspensiones celulares es la optimización de las concentraciones de los reguladores de crecimiento. La relación entre auxinas y citoquininas podrá determinar la producción final de los compuestos de interés y esta relación variará en función de la planta con que se trabaje, puesto que no existen reglas empíricas a este respecto. En relación con ello, previamente se había observado que la quinetina, en *Haplopappus gracilus* estimula la producción de antocianos mientras que en cultivos celulares de *Populus* los inhibe (Mok y col., 1976). Por otro lado, el 2,4-D en cultivos celulares de *Daucus carota* estimula la producción de carotenoides mientras que en cultivos de callos de *Oxalis linearis* inhibe la formación de antocianos (Rao y Ravishankar, 2002). Esta misma hormona, ha sido considerada activadora, para la formación de callo en otras especies de la familia *Apiaceae*, a la que pertenece *Centella asiatica* (Nath y Buragohain, 2005), mientras que en nuestros estudios se mostró de escasa actividad (ver apartado 3.2)

Nath y col. (2005) establecieron suspensiones celulares de *C. asiatica*, mediante la combinación de ANA 1 mg/l + BA 1 mg/l, que fue la misma combinación hormonal que utilizaron estos autores para la inducción de callo. En este estudio, este medio provocaba en las suspensiones celulares un aumento de biomasa del 946% del PS, respecto del inóculo inicial, mientras que en callo el aumento fue del 270%. A nivel de producción de asiaticósido, se obtuvieron 494,6 µg/g PS en las suspensiones celulares y en los callos 190,48 µg/g PS. Con estos resultados los investigadores concluyeron que es necesario un producción correcta de

Resultados y discusión

biomasa por unidad de volumen de la suspensión celular, para obtener una elevada producción del compuesto bioactivo, ya que en determinados casos la biomasa y la producción pueden presentar una correlación negativa (Dicosmo y Misawa, 1996).

Los hechos precedentes nos indujeron a seleccionar el medio diseñado por el grupo de Nath, como óptimo para la biosíntesis de centelósidos y estudiar su producción, comparando los resultados con los obtenidos en el medio optimizado por nosotros para el crecimiento [MS+2,4-D 2 mg/l+BA 0,1 mg/l]. En ambos medios, la máxima producción de madecasósido y asiaticósido se alcanzó a los cinco días del inicio de cultivo, sin que las diferencias de las producciones alcanzadas en los dos medios fueran significativamente distintas (Anexo tabla 12; P-valor=0.1412). Por el contrario, el factor tiempo sí afectó significativamente a la producción de centelósidos a lo largo del cultivo en cada medio. La menor producción de los cultivos celulares obtenidos por nuestro grupo en relación a los resultados del grupo de Nath (Fig. 83), podría deberse a la edad del cultivo, ya que se ha comprobado que cuanto más antiguo y más subcultivos tenga una suspensión celular, más probable que exista una pérdida de las características de interés y una mayor inestabilidad en la producción de los metabolitos secundarios. Estas variaciones podrían estar causadas por diferentes factores, como mutaciones que se dan en el material no diferenciado, variaciones de los niveles de poliploidía que pueden alterar la producción y la variabilidad inherente asociada con los procesos de subcultivos repetidos (Kolewe y col., 2008).

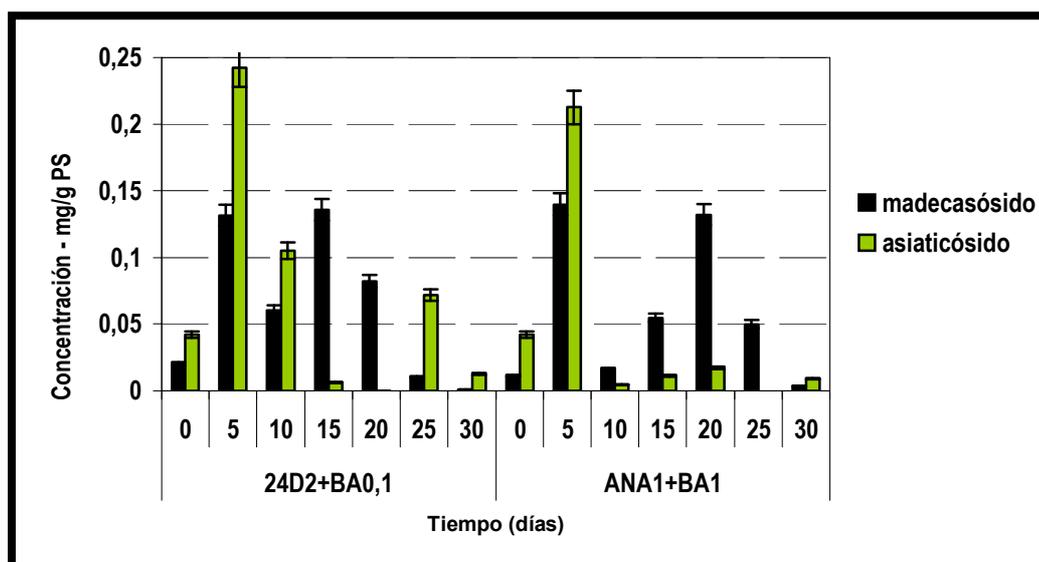


Figura 83-. Comparación de los niveles de producción de madecasósido y asiaticósido en células de suspensión, entre los medios MS + 2,4-D(2) + BA(0,1) y MS + ANA(1) + BA(1) .

Resultados y discusión

3.9.3-. Elicitación de cultivos celulares

La elicitación es una estrategia generalmente usada para mejorar la producción de principios activos, ya que algunos elicitores tienen como diana genes del metabolismo secundario de plantas. La aplicación exógena de elicitores, concretamente de jasmonato de metilo (MeJa) se ha probado en diferentes sistemas como en *Taxus* sp. (Yukimune y col., 1996; Bonfill y col., 2003) y *Catharantus roseus* (Lee-Parsons y Royce, 2006), obteniendo mayor producción de los compuestos de interés. En nuestro caso, inicialmente se probó la adición de MeJa a la misma concentración que se había probado previamente en plantas, 0,1 mM (ver apartado 3.6), para mejorar la producción de centelósidos.

El crecimiento celular de las suspensiones, medido como peso fresco, mostró un ligero descenso al inicio del cultivo, debido a la fase de retardo, en la que las células se adaptan a las condiciones de cultivo y se preparan para los procesos de mitosis, que condicionan el desarrollo de la fase de crecimiento lineal, que duró hasta el día 15, momento a partir del cual el crecimiento medido como peso fresco, se mantuvo prácticamente constante hasta el final del cultivo, a los 30 días (Fig. 84). Esta pauta de crecimiento es típica de los cultivos de células vegetales y ya había sido observada previamente en numerosas especies (Wentzinger y col., 2002). El estudio estadístico de los resultados demostró que no existían diferencias significativas entre los cultivos elicitados y los control, si se consideraban los factores tiempo y el tratamiento por separado, pero sí en combinación, es decir que el tratamiento de elicitación provocó un significativo descenso del peso seco celular, pero únicamente en la última etapa del cultivo (Anexo tabla 13, P-valor=0.0192).

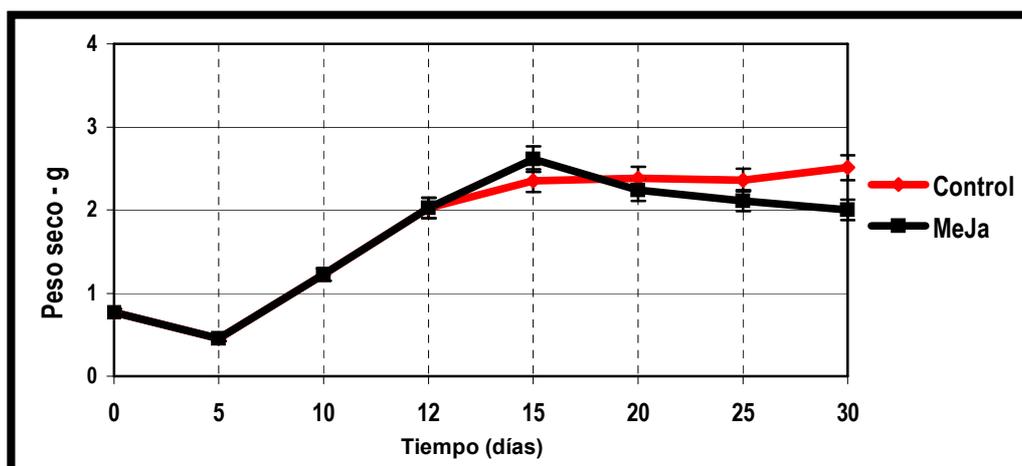


Figura 84-. Curso del crecimiento celular (medido como peso seco) del control (C) y la tratada (MJ) con jasmonato de metilo a 0,1 mM, a lo largo de 30 días.

Resultados y discusión

El análisis de los contenidos de centellósidos, reveló que existían diferencias significativas entre la producción de los cultivos tratados y no tratados con el elicitor (Anexo tabla 14; P-valor=0.000). Los resultados de la figura 85 demuestran que la adición de MeJa incrementó de forma significativa los contenidos de madecasósido y asiaticósido, sobre todo al inicio del tratamiento, 4 días después de la adición del MeJa, momento en el que la suma de ambos compuestos fue 12 veces superior a la del control. En fases tardías de la elicitación, el efecto del MeJa sobre la producción de saponinas fue prácticamente inexistente. Los resultados demuestran también, que los contenidos máximos de saponinas se alcanzan durante la fase de crecimiento estacionario, mostrando la clara competencia entre metabolismo primario y secundario, ya evidenciada en cultivos celulares de otras especies vegetales (Kurosaki y col., 1985).

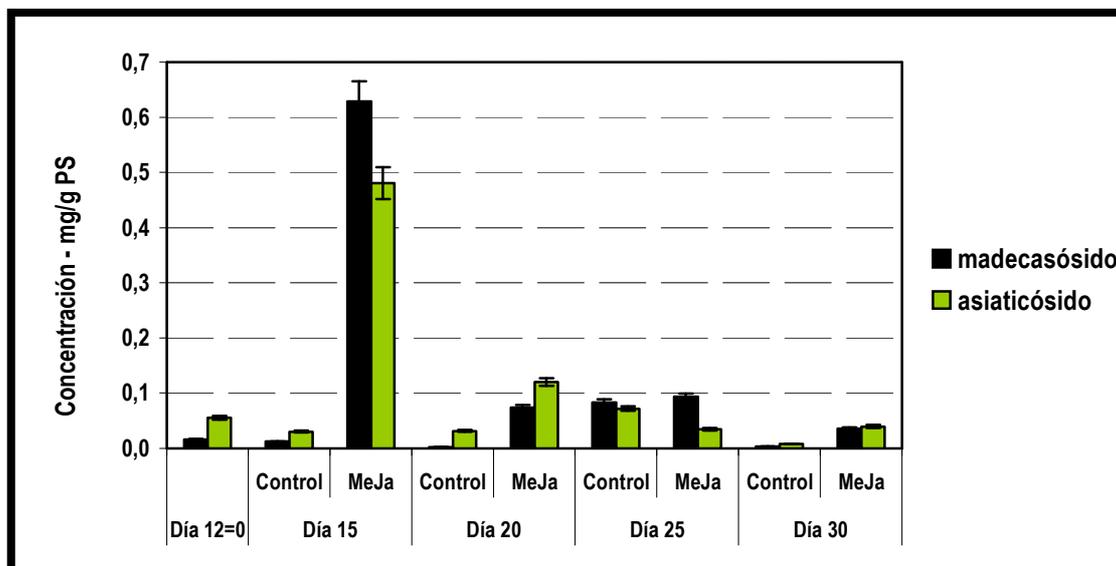


Figura 85-. Efecto del jasmonato de metilo en cultivos celulares de *C. asiatica* sobre la producción de centellósidos, con 0,1 mM MeJa.

Como se ha comentado previamente, la ruta biosintética de saponinas comparte precursores con la vía metabólica de los fitoesteroles, como son el escualeno o el 2,3-óxido de escualeno. Por ello, en este estudio también se analizaron los niveles de los principales fitoesteroles, para comprobar si el flujo de carbono derivado hacia la vía de saponinas en respuesta al MeJa, procedía de la vía de los fitoesteroles.

El análisis de los contenidos de esteroides de las suspensiones celulares control y elicidadas (Fig. 86), demuestra que los niveles de fitoesteroides variaron de forma significativa y diferente, en función de su naturaleza química y origen biosintético. En relación con los

Resultados y discusión

contenidos totales de fitoesteroles (Fig. 87), los resultados de nuestro trabajo indican que el MeJa ejerció un significativo efecto inhibitor en la biosíntesis y/o acumulación de estos compuestos (Anexo tabla 14a-14b; P-valor=0.0000), si bien, la respuesta al tratamiento elicitor no fue idéntica para todos los fitoesteroles estudiados. Por ejemplo, en el caso del sitosterol, el MeJa, provocó una disminución significativa de la producción (Anexo tabla 15A; P-valor=0,0000), siendo de 51 $\mu\text{m/g}$ PS en el cultivo tratado y de 173 $\mu\text{m/g}$ en el control, tras 8 días del tratamiento elicitor. Mientras que la suma de los contenidos de estigmasterol y campesterol fue similar o ligeramente superior, en los cultivos control y tratados (Fig. 86, días 15 y 25 de cultivo) (Anexo tabla 15B; P-valor=0.0005).

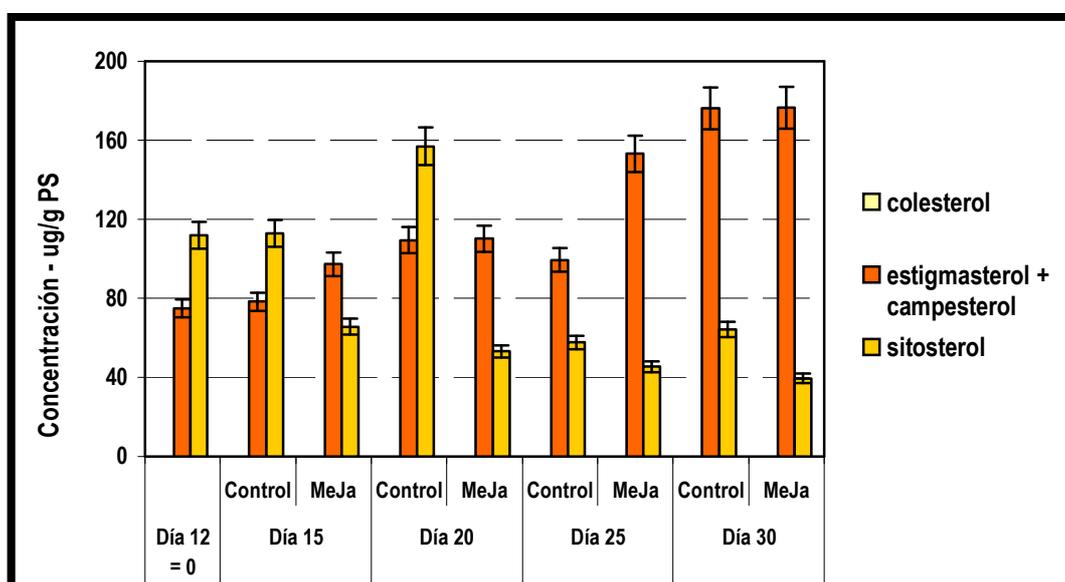


Figura 86-. Curso de los niveles de los fitoesteroles analizados en los cultivos celulares control y los elicitados.

Sin embargo a nivel de producción de fitoesteroles totales, el MeJa provocó una disminución de estos respecto al control (Fig. 87), con diferencias significativas (Anexo tabla 16; P-valor= 0.0000), debido probablemente al acusado descenso de los niveles de sitosterol.

Resultados y discusión

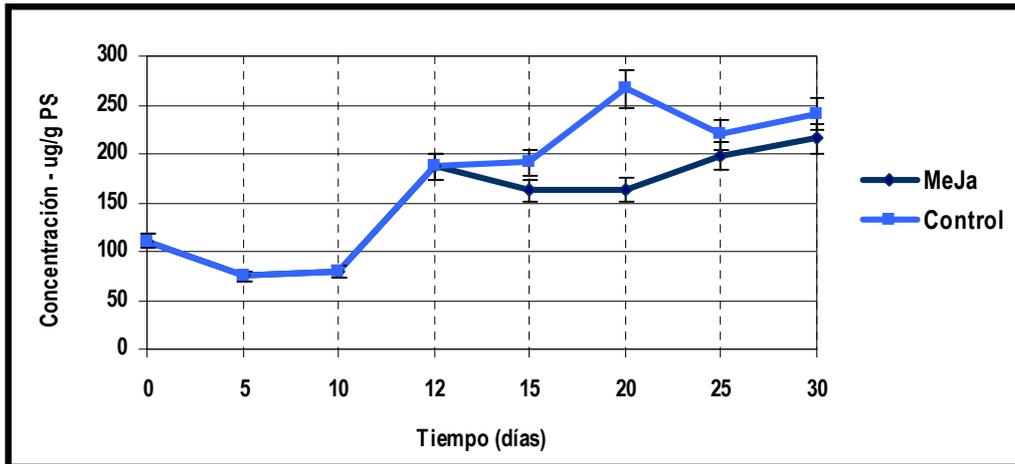


Figura 87-. Curso de la producción de fitoesteroles totales en relación al tiempo de cultivo, de las suspensiones celulares de *C. asiatica* control y tratadas con 0,1 mM MeJa.

La diferencia del efecto del MeJa sobre cada uno de los fitoesteroles podría explicarse debido a su diferente origen biosintético. Todos ellos proceden de un precursor común, el cicloartenol, sin embargo en pasos posteriores siguen diferentes vías, el campesterol se forma a partir del 24-metilen colesterol, mientras que sitosterol y estigmaesterol se obtienen a partir del 24-etiliden lofenol (Fig. 88). De esta forma, nuestros resultados parecen sugerir que la reducción en los niveles de fitoesteroles en las líneas celulares tratadas con MeJa, se debería fundamentalmente, a una inhibición de la actividad de las enzimas que participan en la vía específica de la formación de sitosterol, aunque esta hipótesis requiere investigaciones posteriores.

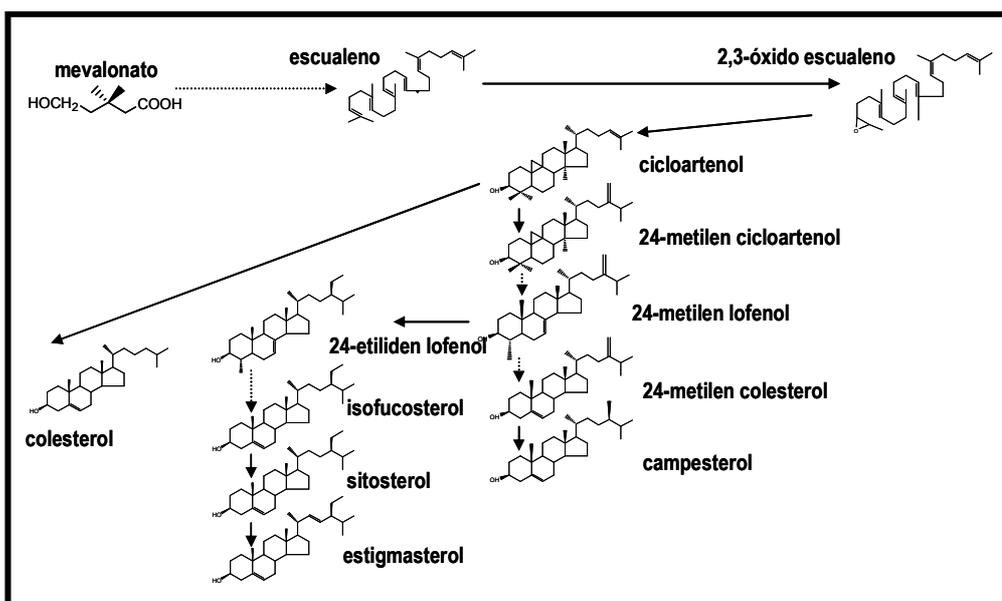


Figura 88-. Síntesis de esteroides en plantas fotosintéticas.

Resultados y discusión

Los esteroides más abundantes en las plantas son el sitosterol, seguido por el estigmasterol y campesterol. La función principal de estos compuestos es la regulación de la fluidez en la membrana plasmática, pero con diferente eficacia. Sitosterol y campesterol son los más efectivos, mientras que el estigmasterol presenta un efecto menor, debido a su doble enlace *trans* en el C-22 (Piironen y col., 2000), por ello una alteración de la relación entre ellos, podría variar la estabilidad de las membranas celulares alterando la viabilidad del cultivo, tal y como se ha demostrado para la línea celular tratada con MeJa, además, esta hipótesis podría explicar parte de los efectos tóxicos manifestados en las plantas de *C. asiatica* tratadas con MeJa (ver apartado 3.6.1).

En estudios previos, también se ha descrito la disminución de los niveles de fitoesteroides en suspensiones celulares elicidadas con MeJa, como en el caso de *Glycyrrhiza glabra* (Hayashi y col., 2003) o *Solanum malacoxylon* (Burlini y col., 2002). Según algunos autores la disminución de esteroides libres sería una respuesta a un estrés de tipo químico o ambiental, como los que se inducen mediante la adición de elicitores (Burlini y col., 2002).

En su conjunto, los resultados comentados, demuestran que la adición del MeJa provoca un aumento de la producción de centelósidos y la disminución de una parte de los fitoesteroides libres presentes en las suspensiones celulares. Todo ello implica que tiene que haber una alteración en el patrón de expresión genética. Se ha observado que la expresión de algunos genes de *Arabidopsis thaliana* es inducida por MeJa (Sasaki y col., 2001), sin embargo, la expresión provocada fue transitoria lo que indica que la acción del MeJa es puntual, en momentos determinados.

En estudios de elicitación, de suspensiones celulares de *Glycyrrhiza glabra*, se ha observado un aumento de los niveles de expresión de β -amirina sintasa (β AS) y escualeno sintasa (SQS), con un máximo de acumulación de transcritos a los 3 días de la elicitación con MeJa, lo que se tradujo en un aumento de la actividad enzimática y de la producción de saponinas de los cultivos (Hayashi y col., 2003). Estudios previos de elicitación con MeJa de plantas de *C. asiatica*, demostraron un aumento de la expresión del SQS, a los 7 días después de la elicitación, a la vez que, un aumento de la producción de centelósidos (Kim y col., 2005d).

Estos resultados, nos indujeron a determinar el nivel de expresión mediante RT-PCR de 3 genes que codifican para enzimas clave de la biosíntesis de triterpenos en *C. asiatica*, el gen SQS, que actúa en un paso común de las vías de formación de triterpenos y esteroides, el gen β AS de la vía de los centelósidos y el de la cicloartenol sintasa (CYS) de la vía de los fitoesteroides (Fig. 90). La expresión del gen de la SQS se vio afectada por el tratamiento con

Resultados y discusión

MeJa, existiendo diferencias significativas entre las muestras elicidadas y las control (Anexo Tabla 17; P-valor=0.0000). En la figura 89 puede observarse que las mayores diferencias se produjeron desde las 48 h del inicio del tratamiento elicitor, hasta el día 15 del cultivo, momento en que se alcanzó un máximo de expresión en los cultivos tratados con MeJa. En ese día, también se produjo un máximo en los contenidos de centellósidos, que después fueron descendiendo hasta el día 30 de cultivo (Fig. 85). Estos resultados demuestran una estrecha relación entre la producción de centellósidos de los cultivos celulares y el nivel de expresión de este gen. Por el contrario, en el medio control sin elicitar, los niveles máximos de expresión se presentaron en una fase más tardía del cultivo (días 20-25). Estos máximos de expresión en el control no fueron acompañados por un aumento de la producción de centellósidos, en cambio, los niveles de producción de fitoesteroles aumentaron en las mismas etapas de cultivo, a partir del día 20. Con todo ello se puede concluir que en una suspensión celular no tratada, la actividad de la escualeno sintasa irá dirigida inicialmente a la producción de fitoesteroles.

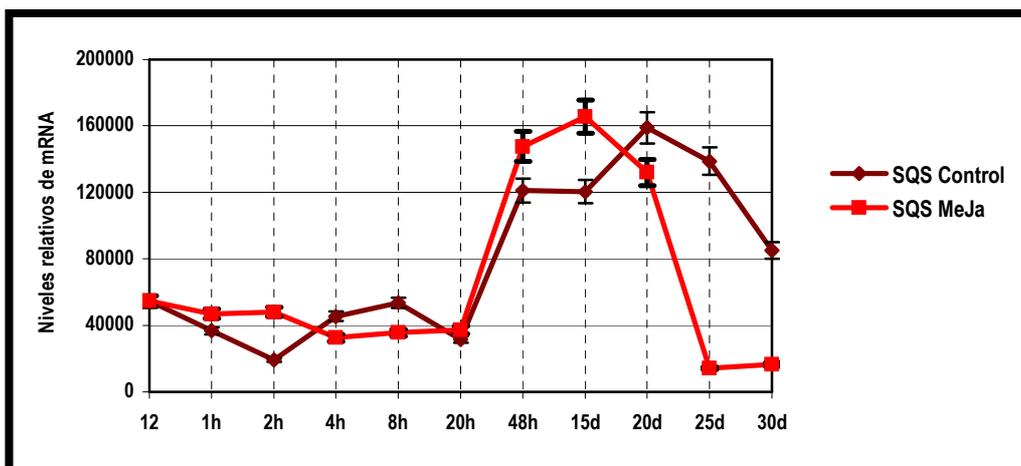


Figura 89-. Expresión del gen de la SQS, en suspensiones celulares de *C. asiatica* control y elicidadas con MeJa a 0,1 mM.

Como ya se ha comentado y se puede observar en la figura 90, la escualeno sintasa (SQS) cataliza la formación de escualeno, para producir el 2,3-óxido de escualeno, un compuesto que actúa como precursor común para la formación de saponinas y fitoesteroles, no siendo un compuesto específico en la ruta biosintética de los centellósidos. Por ello, también se analizó el nivel de expresión del gen que codifica para la β -amirina sintasa, una ciclasa que actúa sobre el 2,3-oxidoescualeno y potencialmente lleva a la formación de las saponinas de interés.

Resultados y discusión

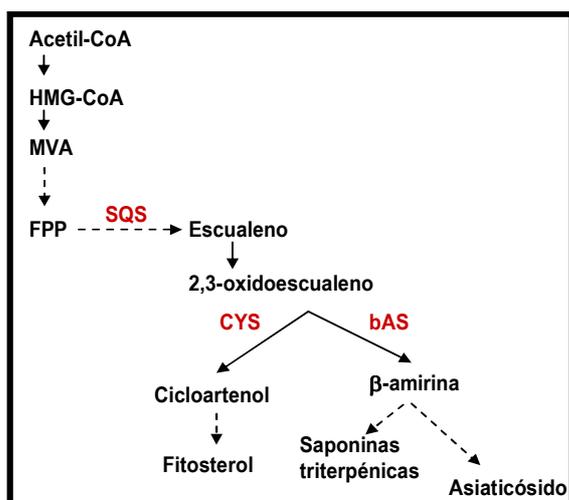


Figura 90-. Ruta de biosíntesis de fitoesteroles y saponinas de *C. asiatica*.

El MeJa a una concentración de 0,1 mM provocó un aumento de la expresión del gen de la β-amirina sintasa, existiendo diferencias significativas entre las células tratadas y las control (Anexo tabla 18; P-valor=0.0000) (Fig. 91). Entre las 2h y 4h después de la adición del elicitor, se produjo un aumento en la expresión del gen, obteniendo un máximo a las 20h, a partir del cual, la expresión fue disminuyendo progresivamente.

En estudios previos de elicitación, en cultivos celulares de *Glycyrrhiza glabra*, se observó un máximo de expresión del gen de la bAS entre las 24 h y los 3 días después de la adición del MeJa (Hayashi y col., 2003), mientras que en suspensiones celulares de *Medicago truncatula*, el incremento del mbAS, en respuesta a MeJa se observó entre las 8-24 h después de la adición del elicitor y a partir de ese momento, los niveles de mRNA fueron decreciendo (Suzuki y col., 2002). Estos experimentos previos, junto con nuestros resultados, revelan que la respuesta en el tiempo a la adición de MeJa, puede variar en función de la especie vegetal.

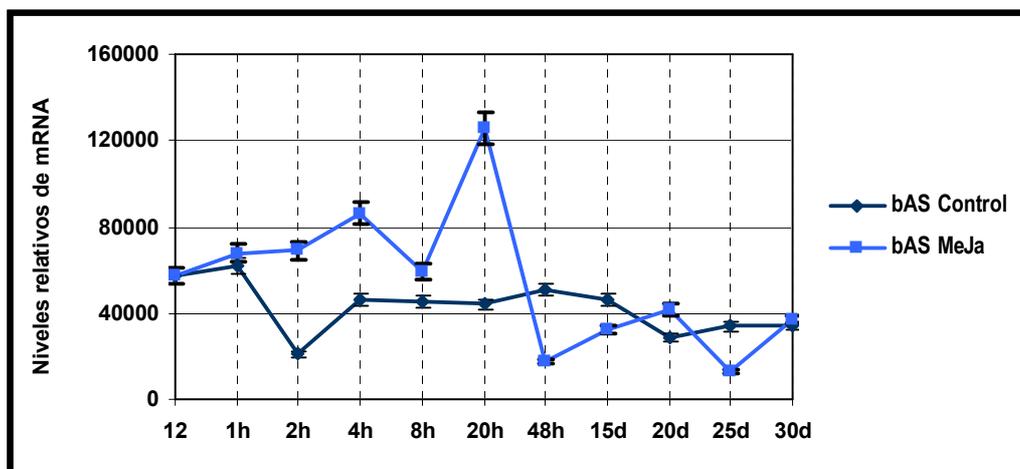


Figura 91-. Curso de expresión del gen de la bAS en suspensiones celulares de *C. asiatica* control y elicidadas con MeJa a 0,1 mM.

Resultados y discusión

Previamente, también se habían realizado estudios de expresión en plantas de *Centella asiatica*, elicidadas con MeJa (Kim y col., 2005b). En este estudio se investigaron los niveles de expresión de *bAS* en hojas, durante 8 semanas, observándose que en la segunda y tercera semana se presentaban los niveles más altos de expresión, mientras que los niveles de saponinas incrementaron de forma más tardía en el tiempo, y fueron aumentando progresivamente, hasta el final del experimento.

En nuestro estudio, el máximo de expresión se dio a las 20 h después de adicionar el elicitor MeJa, momento a partir del cual, la expresión del gen *bAS* fue significativamente menor. Por el contrario, los máximos contenidos de saponinas se obtuvieron el día 15, es decir, 72 horas después del inicio del tratamiento elicitor. De esta forma se confirma que la respuesta del gen de la *bAS* a la elicitación, fue similar en plantas y cultivos celulares de *C. asiatica*, y que en ambos sistemas biológicos se produjo un desfase en el tiempo, entre la activación genética y la biosíntesis de metabolitos secundarios (Fig. 92).

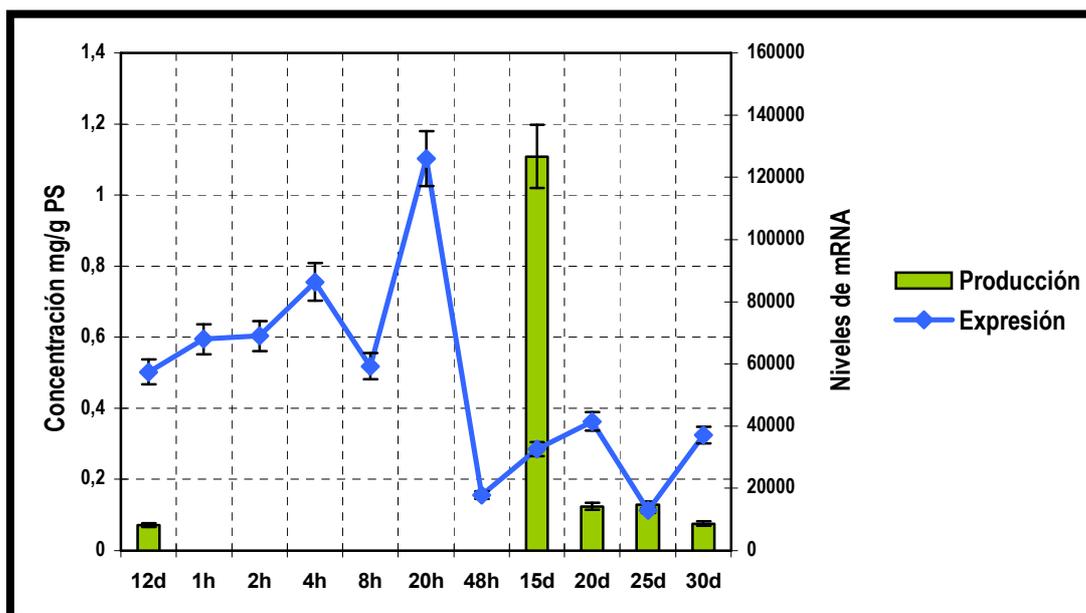


Figura 92-. Relación entre el nivel de expresión del gen de la *bAS* y la producción total de centelósidos.

Como se ha comentado en apartados anteriores, la ruta biosintética de las saponinas comparte precursores comunes con la ruta de los fitoesteroides, lo que hace que ambas rutas puedan estar en competencia y responder de diferente manera en las situaciones de estrés, como puede ser el caso de la elicitación. Nuestros resultados parecen confirmarlo, puesto que como ya se ha indicado, la producción de saponinas se vio incrementada por efecto del elicitor, por el contrario los niveles fitoesteroides se vieron disminuidos. El descenso en los niveles de fitoesteroides de los

Resultados y discusión

cultivos elicitados podría estar relacionado con un bajo nivel de expresión de algunas de las enzimas claves de su biosíntesis, nuestros resultados también lo sugieren. En la figura 93 se puede observar, que la adición de MeJa a los cultivos celulares provocó un significativo descenso (Anexo tabla 19; P-valor=0.0000) de los niveles del mRNA de la cicloartenol sintasa (CYS), la terpeno ciclasa específica de la formación de fitoesteroles, a las pocas horas del tratamiento elicitor. Posteriormente los niveles de expresión se recuperaron algo, manteniéndose en proporciones similares al cultivo control sin elicitar.

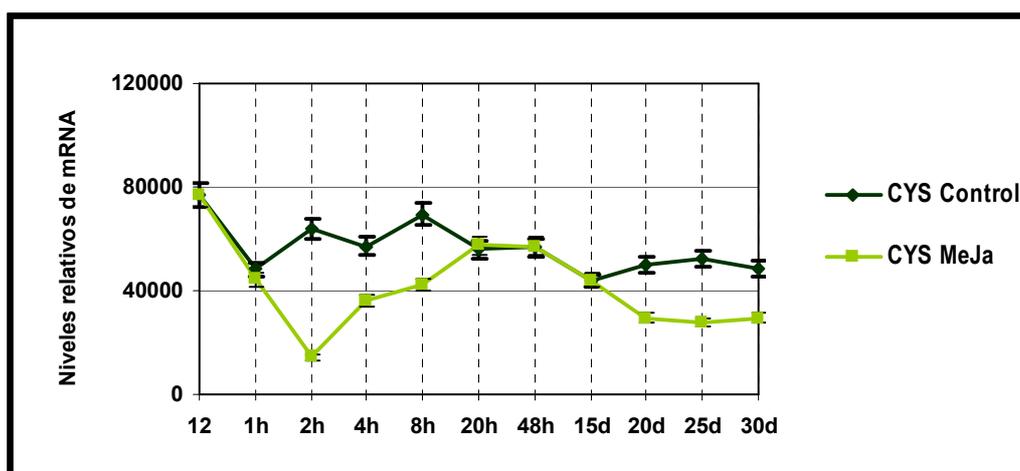


Figura 93-. Curso de la expresión del gen de la cicloartenol sintasa en suspensiones celulares de *C. asiatica* control y elicitadas con MeJa a 0,1 mM.

Una disminución de la expresión de la CYS, ha sido observada previamente en otros trabajos, como los estudios realizados en suspensiones celulares de *Medicago truncatula* elicitadas, en las que a las pocas horas de la elicitación, se produjo un fuerte descenso de los niveles de expresión de la CYS, mientras que aumentó la expresión de la bAS, al mismo tiempo que se producía un incremento en los contenidos de saponinas de esta especie vegetal (Suzuki y col., 2005). Este sistema de regulación, también se ha observado en cultivos celulares de tabaco en los que compiten la formación de sesquiterpenos y esteroides (Vögeli y Chappell, 1988). En otras plantas, como la *Glycyrrhiza glabra*, el tratamiento del MeJa no provocó diferencias significativas en la formación de los fitoesteroides respecto al control, sin embargo, también favoreció a la formación de saponinas (Hayashi y col., 2003).

Los estudios de elicitación realizados con plantas de *C. asiatica*, revelaron un fuerte descenso de los niveles de mRNA de CYS respecto al control a los tres días, disminuyendo posteriormente hasta el final del estudio a los 14 días, siempre respecto al control (Kim y col., 2005c). La CYS está indirectamente relacionada con el crecimiento celular en plantas, pues sus

productos son constituyentes primordiales de las membranas plasmáticas. Este hecho, se ha corroborado en estudios de cultivos celulares de tabaco, observándose una clara correlación, entre el aumento del crecimiento celular y el incremento del contenido de esteroides.

Para explicar porqué el MeJa favorece la ruta de formación de saponinas respecto a la de los fitoesteroides, se ha de pensar en las respuestas de las plantas frente a un determinado estrés. La planta delante de un ataque, responde normalmente sintetizando metabolitos secundarios de defensa, en el caso de *C. asiatica* estos compuestos serían las saponinas, y al mismo tiempo, suele producirse también una inhibición del metabolismo primario (fitoesteroides), que trae como consecuencia también un descenso del crecimiento vegetativo.

- Efecto del aumento de la concentración del elicitador MeJa 0,2 mM

Como ya se ha indicado, la elicitación es una estrategia para favorecer la producción de metabolitos secundarios. La respuesta puede variar dependiendo de diversos factores como especificidad de los elicitadores, intervalo de adición, las condiciones de cultivo o la propia concentración, a la que se adiciona el elicitador. Este último factor, puede afectar a la intensidad de la respuesta, y cada planta puede presentar una respuesta diferente a la misma concentración de elicitador, lo que provoca que sólo se pueda encontrar la dosis efectiva, empíricamente. Ejemplo de ello, es que una concentración de 20 mg/l de quitosán provoca un aumento de antraquinonas en cultivos celulares de *Rubia akane*, mientras que para elicitar cultivos de *Mentha piperita* e incrementar la producción de mentol, se necesita aumentar la concentración de quitosán hasta 200 mg/l. En general, hay descritas dos tipos de curvas dosis-respuestas a la elicitación, una que corresponde al perfil de saturación típico, en que hay efecto del elicitador hasta cierto punto y otras en que hay una concentración óptima de elicitador y después se ejercen efectos tóxicos (Vasconsuelo y Boland, 2007).

En nuestro caso se varió la concentración del elicitador, aumentándola a 0,2 mM para determinar si un aumento de concentración implicaría un aumento de producción o por el contrario la adición de MeJa a una concentración 0,1 mM en el medio de cultivo es la óptima para promover la producción de saponinas en *C. asiatica*, tal como se había sido descrito anteriormente para la producción de asiaticósido (Kim y col., 2004a).

De igual modo que la adición de MeJa provocaba alteraciones morfológicas en las plantas de *C. asiatica* elicidadas (ver apartado 3.6.1) y una disminución de la viabilidad en las suspensiones tratadas a una concentración de 0,1 mM (ver apartado anterior), el aumento de la concentración del elicitador a 0,2 mM, también provocó una significativa inhibición del crecimiento

Resultados y discusión

en las suspensiones celulares (Anexo tabla 20; P-valor=0.0003), en relación con el control sin elicitar (Fig. 94).

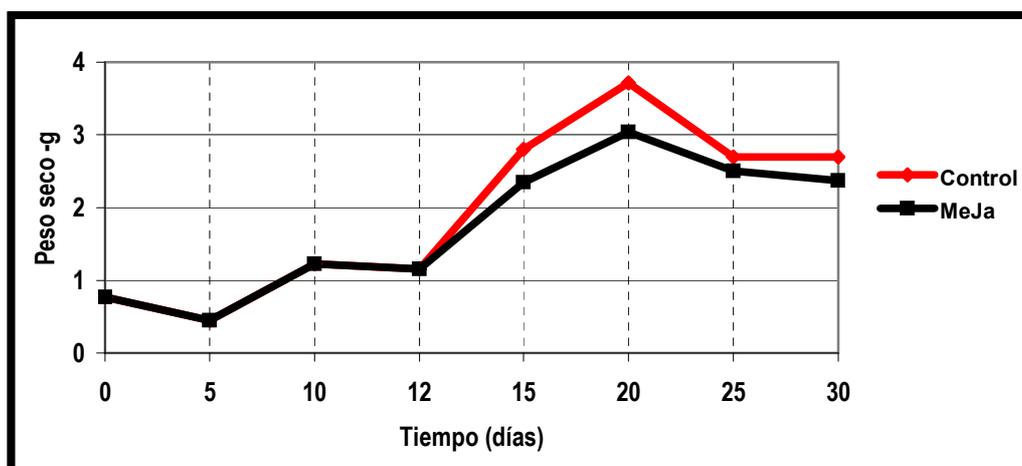


Figura 94-. Curso del crecimiento celular de la línea control y la línea tratada con jasmonato de metilo a 0,2 mM, a los largo de 30 días.

Esta significativa disminución del peso se refleja también en la disminución de la viabilidad celular (Fig. 95). Comparando estos resultados con los obtenidos al elicitar la suspensión celular con MeJa 0,1 M (Fig. 84), se puede observar que al aumentar la concentración del elicitor se incrementa de forma significativa la muerte celular (Anexo tabla 21). Reflejo de ello, también sería el hecho, de que la inhibición del crecimiento fuera superior en los cultivos tratados con 0,2 mM de MeJa que en los cultivos tratados con la concentración menor (0,1 mM). Estudios de elicitación, realizados para analizar las diferencias transcripcionales en *Medicago truncatula* demostraron que de varias concentraciones de MeJa (desde 0,5 mM a 5 mM), la concentración que produjo el máximo de de acumulación de transcritos de β -amirina sintasa, fue la de 0,5 mM, mientras que concentraciones más elevadas del elicitor como la de 5 mM, fueron tóxicas, para las suspensiones celulares (Suzuki y col., 2005). Como se ha indicado anteriormente, cada especie vegetal responde de diferente manera, al ser tratada, con distintas concentraciones de elicitores, de forma que son los resultados obtenidos empíricamente, los que finalmente permiten definir los parámetros óptimos, para la mejora de la producción.

Resultados y discusión

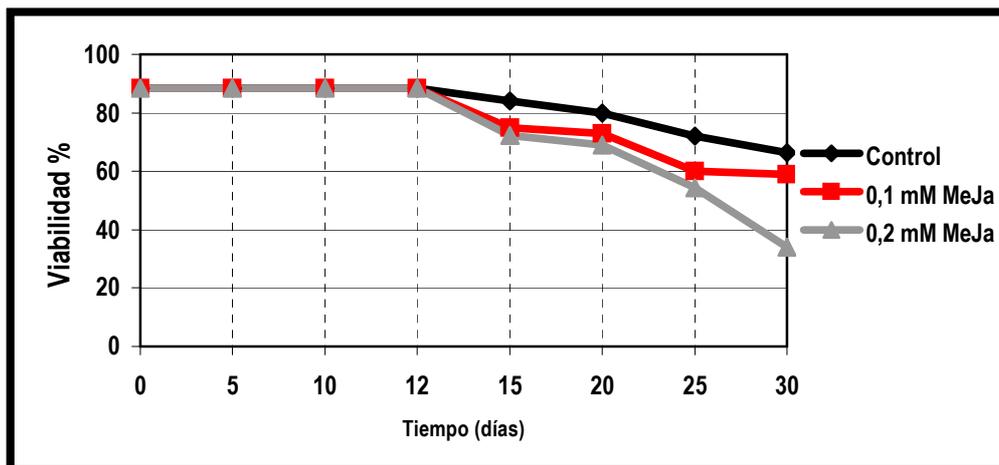


Figura 95-. Curso de la viabilidad de las suspensiones celulares control y elicidadas con 0,1 mM o 0,2 mM, durante los 30 días del estudio.

El MeJa se ha propuesto como una molécula señal en la ruta de biosíntesis de fitoalexinas o para la activación de respuestas de defensa de la planta delante de un ataque de insectos, esta activación provocaría un aumento de compuestos propios del metabolismo secundario (McConn y col., 1997). En determinados casos, un aumento de la concentración del elicitor puede inducir un aumento de producción. Por ejemplo, en estudios con regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) se probaron concentraciones de MeJA de 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M, observando un aumento de saponinas propias de esta especie, cuanto mayor era la concentración de MeJa (Hayashi y col., 2003).

En nuestro estudio, al aumentar la concentración del MeJa de 0,1 a 0,2 mM, pudimos comprobar, previo el análisis estadístico de los resultados, que existían diferencias significativas (Anexo tabla 22; P-valor=0.0000) entre la producción de centelósidos del cultivo control y las suspensiones celulares elicidadas. Sin embargo, el efecto de la elicitación, en este caso, no fue el esperado, ya que había mayor producción de centelósidos en el control, que en las células tratadas con MeJa (Fig. 96). De estos resultados se puede deducir, un efecto tóxico del MeJa a la concentración 0,2 mM sobre las células, que se refleja no sólo en una disminución del crecimiento y de la viabilidad celular, sino también en la biosíntesis de metabolitos secundarios. En relación a los niveles relativos de centelósidos, el tratamiento con MeJa provocó un descenso de ambas saponinas consideradas, el asiaticósido y el madecasósido.

En estudios realizados por Kim y col. (2005) con planta entera de *C. asiatica*, en el que se probaron diferentes concentraciones de elicitor MeJa, la concentración de 1 mM provocó la disminución de la expresión génica de bAS y SQS, la disminución del mRNA de estos genes provocaría una disminución en la producción de los principios activos.

Resultados y discusión

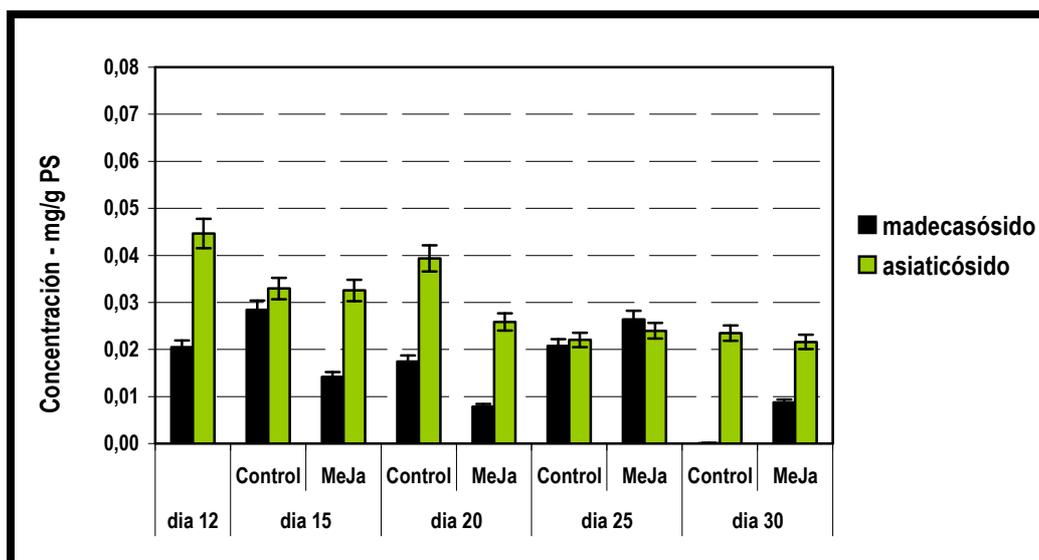


Figura 96-. Efecto del jasmonato de metilo a la concentración de 0,2mM, en cultivos celulares de *C. asiatica*.

A nivel de fitoesteroles, el aumento de la concentración del elicitador a 0,2 mM provocó un efecto muy similar al de la baja concentración del elicitador (0,1 mM), produciéndose una disminución de los fitoesteroles, en las suspensiones celulares elicidadas (Fig. 97), con diferencias significativas entre el control y el cultivo tratado (Anexo tabla 23; P-valor=0.0001).

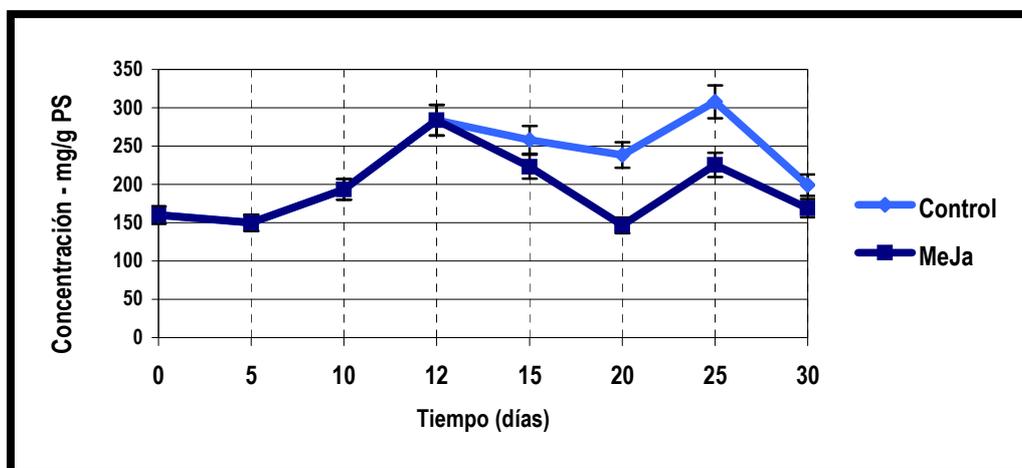


Figura 97-. Curso de los niveles de fitoesteroles totales en las suspensiones celulares de *C. asiatica* control y tratadas con 0,2 nM MeJa a lo largo de 30 días.

El efecto del MeJa 0,2 mM sobre los niveles individuales de los esteroides estudiados, siguió el mismo patrón que el producido por la concentración de 0,1 mM (Fig. 98). El colesterol sólo apareció en trazas no cuantificables, como en el caso anterior de elicitación y en el estudio de producción de fitoesteroides en planta (ver apartado 3.6.3). Como ya se ha comentado, en plantas los principales fitoesteroides son el sitosterol, campesterol y estigmasterol, mientras que la

Resultados y discusión

presencia de colesterol libre es insignificante, ya que a diferencia de los animales donde el colesterol es el principal esteroide componente de membranas, en plantas el colesterol no se acumula, y es rápidamente utilizado como precursor de otros compuestos de interés para la planta, como son algunos compuestos de actividad hormonal como los brasinoesteroides (Piñol M. T. y col. 2008).

Los niveles de campesterol y estigmasterol no disminuyeron con la adición del MeJa, y en las suspensiones tratadas, el nivel medio fue de 139,135 $\mu\text{g/g}$ PS mientras que en las control fue de 119,098 $\mu\text{g/g}$ PS, existiendo diferencias significativas entre ambos valores (Anexo tabla 24B; P-valor=0.0000)

Por el contrario los niveles de sitosterol si se vieron significativamente disminuidos (Anexo tabla 24A; P-valor=0.0003). En general el MeJa provocó un descenso del sitosterol, siendo el valor medio a lo largo del cultivo de 59,39 $\mu\text{g/g}$ PS en los cultivos tratados y de 124, 15 $\mu\text{g/g}$ PS en el control.

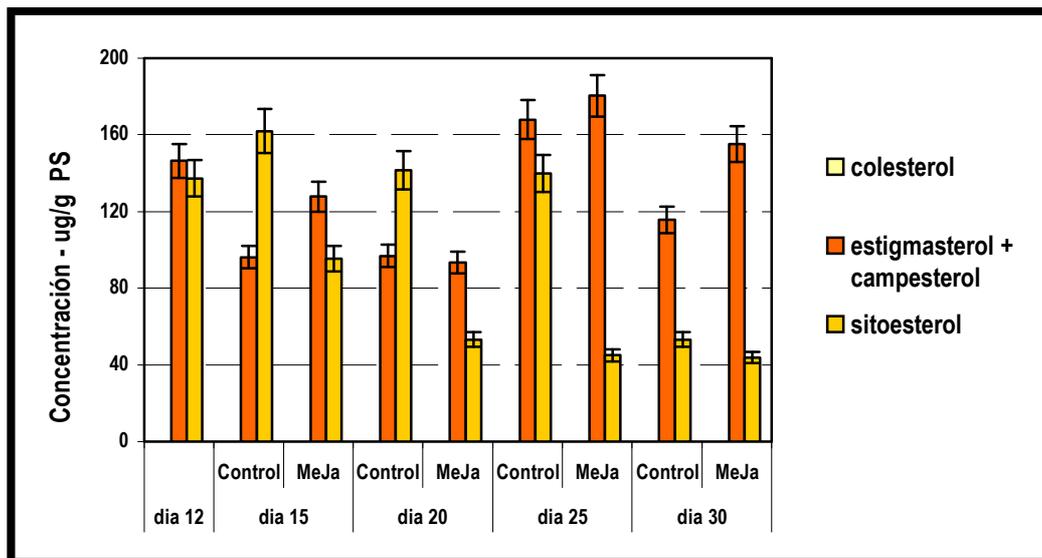


Figura 98-. Curso de los niveles individuales de fitoesteroles en los cultivos celulares control y en los elicitados con MeJa 0,2 mM.

Como ya se ha comentado, los esteroides juegan un importante papel fisiológico en procesos vinculados con el desarrollo, como precursores de los brasinoesteroides y componentes esenciales en las membranas plasmáticas, mitocondriales o del retículo endoplasmático. La presencia del grupo hidroxilo libre en los esteroides es un factor importante para las interacciones con los fosfolípidos y proteínas de membrana. De igual modo, su propiedad anfifílica es

Resultados y discusión

resultante de la presencia de su cadena lateral, de modo que cuanto más larga, más hidrofóbico será el esteroles. De este modo, los esteroides con 28 o 29 átomos de carbono son más hidrofobos y de menor solubilidad micelar que aquellos compuestos con menor número de carbonos, como el colesterol con 27 átomos, por ello este último actúa dando mayor estabilidad a la membrana (Piironen y col., 2000). Variaciones en la presencia de estos compuestos, pueden alterar la estabilidad de la membrana plasmática y por defecto, actuar sobre la viabilidad celular.

A nivel de expresión genética, al contrario de lo que se esperaba, el efecto de la elicitación con 0,2 mM de MeJa, no siguió el mismo patrón que el obtenido con la menor concentración de MeJa (0,1 mM) sobre los tres genes considerados SQS, bAS y CYC. La elicitación con 0,2 mM provocó una significativa disminución (Anexo tabla 25; P-valor=0.0000) de la expresión del gen de la SQS respecto al control (Fig. 99). La disminución del nivel de expresión este gen podría, en parte, ser la causa del comentado descenso de los niveles de saponinas y fitoesteroides de estos cultivos, en relación al control no elicitado y al cultivo elicitado con MeJa 0,1 mM. Como es sabido, la escualeno sintasa cataliza la formación de escualeno un precursor común para la formación de saponinas y fitoesteroides.

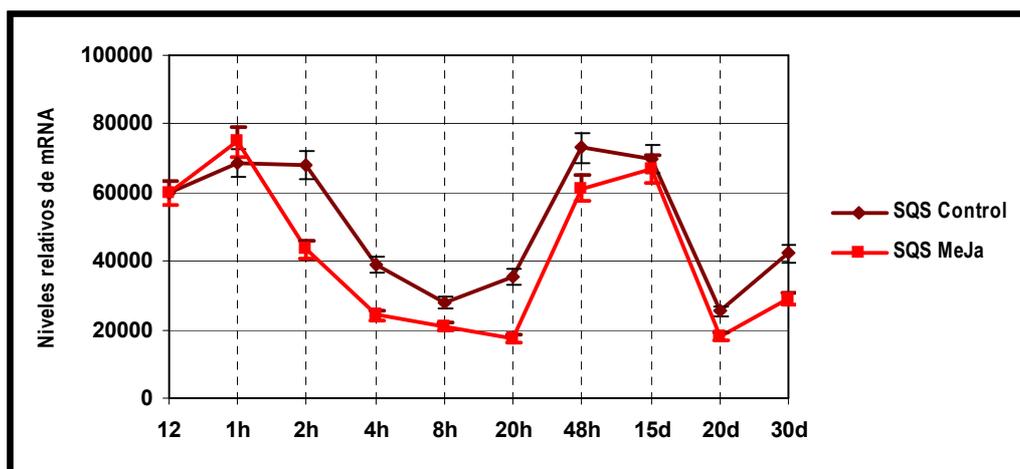


Figura 99-. Curso de la expresión del gen de la escualeno sintasa en las suspensiones celulares de *C. asiatica* control y elicitadas con MeJa a 0,2 mM.

Considerando una enzima específica de la ruta biosintética de centelósidos, como es la bAS, los resultados de la Fig. 100 muestran que la adición de MeJa 0,2 mM provocó un significativo incremento (Anexo tabla 26; P-valor=0.0004) de la expresión enzimática a las 8h del inicio del tratamiento, lo que supone un importante adelanto en el tiempo al ser comparados estos valores con los obtenidos tras la elicitación del cultivo con la concentración de 0,1 mM de MeJa, donde el máximo de expresión se produjo a las 20 h (Fig. 91). Sin embargo, el incremento de expresión del gen de la bAS provocado por la alta concentración de MeJa, no se tradujo en un aumento en

Resultados y discusión

la producción de centelósidos (Fig. 96). En fases posteriores del cultivo, el efecto del elicitor provocó una disminución de la expresión genética (Fig. 100). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Kim y col., 2005b), quienes probando diferentes concentraciones de MeJa en planta de *C. asiatica*, observaron que concentraciones elevadas de elicitor provocaban niveles de expresión de la *bAS* similares o ligeramente más elevados que los controles, sin embargo, los valores de asiaticósido eran siempre inferiores a los niveles obtenidos tras la elicitación con la concentración de 0,1 mM de MeJa.

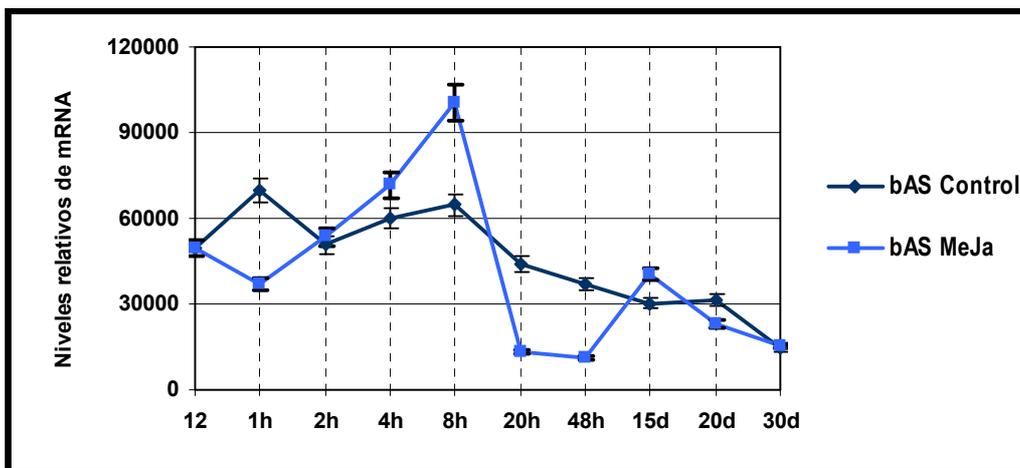


Figura 100-. Expresión del gen de la β -amirina sintasa en suspensiones celulares de *C. asiatica* control y elicidadas con MeJa a 0,2 Mm.

Por el contrario, la concentración 0,2 mM de MeJa provocó una respuesta muy similar a la obtenida con la concentración de 0,1 mM (Fig. 93), sobre el curso de expresión del gen que codifica para la CYS, una enzima que como se ha comentado participa en la formación de fitoesteroles (Fig. 101), aunque en este caso, el descenso en relación al control además de significativo (Anexo tabla 27; P-valor=0.0000), fue mucho más acusado que el provocado por la concentración más baja del elicitor. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente con plantas de *C. asiatica*, en los que se demostró que un aumento de concentración de MeJa provocaba un fuerte descenso de la actividad de CYS (Kim y col., 2005b).

La significativa disminución en la expresión de CYS estuvo acompañada de unos niveles de fitoesteroles totales también significativamente inferiores a los de los cultivos control no tratados con MeJa (Fig. 98).

Resultados y discusión

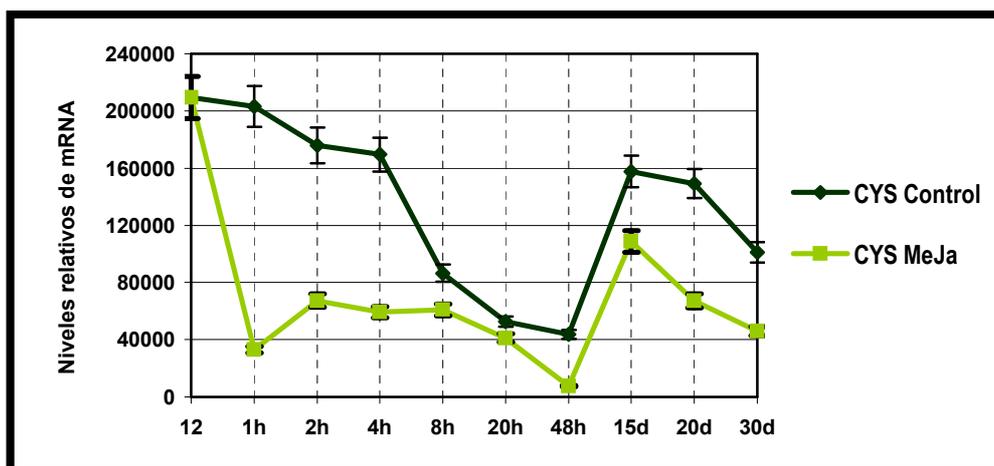


Figura 101-. Expresión del gen de la cicloartenol sintasa en suspensiones celulares de *C. asiatica* control y elicidadas con MeJa a 0,2 Mm.

En su conjunto, los resultados comentados en este apartado demuestran que el MeJa actúa incrementando la producción de centelósidos en cultivos celulares de *C. asiatica*, y que la concentración 0,1 mM es más efectiva para la elicitación. Además, también se demuestra que existe una competencia por el flujo de carbono entre la vía de formación de saponinas y la de fitoesteroles, y que en ambas vías actúa el MeJA provocando una activación y/o inhibición de la expresión de algunos genes que desempeñan papeles claves. De esta forma, se ha podido demostrar, que la adición del elicitor a la concentración 0,1 mM activa la expresión de los genes que codifican para la SQS y la bAS lo que se traduce en un incremento de la producción de centelósidos de los cultivos, pero por el contrario, inhibe la expresión del gen de la CYS lo que conlleva a una disminución de los niveles de fitoesteroles. Todo ello puede conducir, a nivel de planta, a una adaptación a las condiciones de estrés y a regular el flujo de carbono implicado en la biosíntesis de triterpenos.

3.10-. Biotransformación: Estudio de la bioconversión de α -amirina en saponinas triterpénicas

Las plantas son fuente de productos valiosos, incluyendo materiales básicos como fibras y resinas. Pero también, de diversos metabolitos secundarios como terpenoides, polifenoles, glucosinolatos y alcaloides que se utilizan como fármacos, agroquímicos, saborizantes, fragancias, colorantes y aditivos de alimentos. Algunos de estos metabolitos secundarios han sido producidos, utilizando herramientas biotecnológicas como los cultivos de células vegetales. Pero en las últimas dos décadas, se ha incrementado el uso de los cultivos celulares para la biotransformación de sustratos exógenos de naturaleza variada, los cuales pueden ser

intermediarios en el metabolismo de la planta o de origen foráneo (Ishihara y col., 2003). Para el desarrollo de las biotransformaciones, resulta evidente que el uso de los cultivos de células vegetales, implica una gran variedad de enzimas, algunas de las cuales no son producidas por otros organismos. Los cultivos de células pueden actuar como sistemas polienzimáticos que biocatalizan la transformación de un sustrato exógeno, en productos más funcionales a través de uno o varios tipos de reacción.

En definitiva, las biotransformaciones mediante suspensiones celulares buscan la realización de gran variedad de reacciones químicas, necesarias para la obtención de los compuestos de interés, a partir de un sustrato adicionado externamente, pudiéndose considerar los cultivos de células en suspensión como biocatalizadores. Estas reacciones van desde hidroxilaciones, oxidaciones de grupos hidroxilos, reducción de grupos carboxilos, hidrogenación o glicosidación, entre otras (Fig. 102), permitiendo cambios en la estructura de la molécula, para obtener un compuesto con actividad biológica a veces modificada y/o incrementada.

Se ha comprobado que muchos cultivos celulares tienen la capacidad de transformar compuestos químicos, accesibles y baratos, en productos de alto valor, de manera sencilla. Las ventajas del uso de los cultivos celulares son:

- a-. Como los vegetales utilizados se cultivan en el laboratorio, bajo condiciones controladas, pueden considerarse sistemas homogéneos y pueden ser accesibles incluso durante años.
- b-. Pueden obtenerse cantidades ilimitadas de cultivos celulares para su uso en las biotransformaciones.
- c-. Los cultivos celulares pueden asimilar grandes cantidades de sustrato y generar los metabolitos deseados.
- d-. Los ciclos normales de crecimiento son entre 1 y 2 semanas, lo que facilita los experimentos en relación a las plantas.

Resultados y discusión

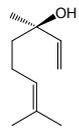
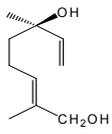
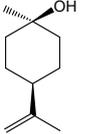
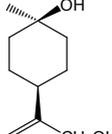
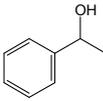
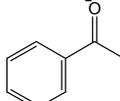
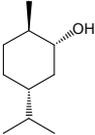
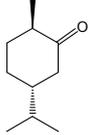
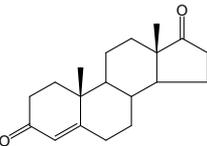
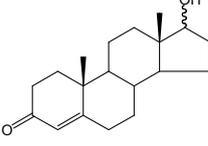
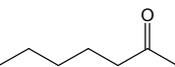
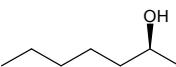
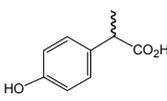
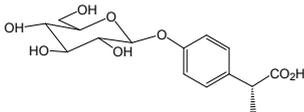
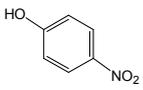
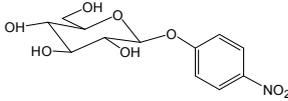
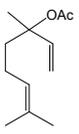
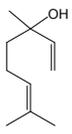
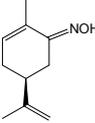
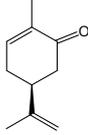
SUSTRATO	PLANTA	PRODUCTO	REACCIÓN QUÍMICA
	<i>Nicotina tabacum</i>		Hidroxilación
	<i>Nicotina tabacum</i>		Hidroxilación
	<i>Spirodela oligorrhiza</i>		Oxidación
	<i>Nicotina tabacum</i>		Oxidación
	<i>Dendrobium phalaeniopsis</i>		Reducción
	<i>Nicotina tabacum</i>		Reducción
	<i>Medicago sativa</i>		Hidrogenación
	<i>Panax ginseng</i>		Glicosilación
	<i>Gardenia jasminoides</i>		Glicosilación
	<i>Lavandula angustifolia</i>		Hidrólisis
	<i>Nicotina tabacum</i>		Hidrólisis

Figura 102-. Ejemplos de diferentes reacciones químicas desarrolladas en suspensiones celulares vegetales.

Actualmente, se está produciendo un incremento en el uso de cultivos celulares para la biotransformación de sustratos exógenos (Giri y col., 2001; Rao y col., 2002). Sin embargo de acuerdo con Fowler y Staford (1992) existen desventajas en su uso:

- (i) los tiempos de crecimiento de las células vegetales desdiferenciadas son mayores que los de los microorganismos.
- (ii) la velocidad de conversión depende de una variedad de factores como la solubilidad de los precursores, la cantidad de encima presente y su localización.
- (iii) la posible presencia de enzimas degradativas de los productos deseados.

Adicionalmente, la biotransformación en cultivos celulares se ha efectuado también con células inmovilizadas. Esta metodología presenta ciertas ventajas con respecto a las suspensiones celulares que incluyen:

- a-. Poder usar el biocatalizador varias veces para efectuar la reacción, por un tiempo prologando.
- b-. Facilitar la recuperación del catalizador y el aislamiento del producto.
- c-. Permitir la concentración de la biomasa y por tanto se logra incrementar la bioconversión del sustrato.

3.10.1.- Aislamiento y análisis cualitativo de amirinas:

Con la finalidad de obtener una fuente comercial y abundante que permitiera el aislamiento eficiente de α - y β -amirina, potenciales precursores de los centelósidos, se procedió a la evaluación cualitativa por cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos hexánicos procedentes de varias resinas comerciales y de distintas plantas medicinales. Para seleccionar las fuentes naturales, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre contenidos en triterpenos presentes tanto en plantas como en resinas. Seleccionándose para este estudio un total de 6 plantas medicinales y 5 resinas (Tabla 15).

Los compuestos α y β -amirina, se pueden aislar con frecuencia de plantas medicinales y además, recientemente se les han atribuido algunas de las propiedades terapéuticas de las plantas que los contienen, como son las acciones, analgésica, antiinflamatoria, antiulcerogénica y antihiper glucémica de *Sideritis taurica*, así como, las acciones antiinflamatoria y analgésica de *Himatanthus sucumba*, atribuidas a α -amirina (Lavoie y Stevanovic, 2005), o las acciones sedantes de *Maytenus forsskaoliana*, antiespasmódica, antiarrítmica y anticolonérgica de

Resultados y discusión

Salvadora persica, antiinflamatoria antipirética y analgésica de *Dalbergia sissoo*, etc. atribuidas a β -amirina (Singh y col., 2002; Nagarajan y Mohan Rao, 2007).

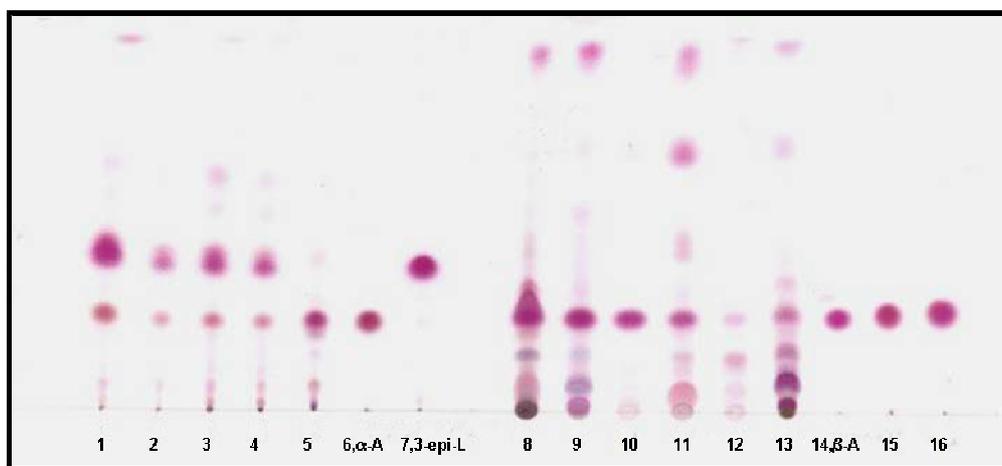


Figura 103-. Análisis por TLC del contenido de triterpenos en las resinas y plantas medicinales estudiadas. 1: copal blanco Tepoztlan; 2: copal blanco Sonora; 3: copal negro; 4: copal piedra; 5: resina Elemi; 6: α -amirina; 7: 3-epi-lupeol; 8: diente de león; 9: olivo; 10: cancerina; 11: corteza de nanche; 12: gayuba; 13: caléndula; 14: β -amirina; 15 - 16: mezcla de α - y β -amirina. Eluyente: hexano, CH_2Cl_2 y MeOH.

La cromatografía por TLC de las plantas y resinas seleccionadas se desarrolló conjuntamente con los estándares de α - y β -amirina (Fig. 103). La α -amirina (R_f 0,25), se visualizó como una banda homogénea de color café, mientras que la β -amirina (R_f 0,25) se presentó como una banda homogénea de color violeta. También se aplicó una muestra de *epi*-lupeol (R_f 0,40), utilizándolo como estándar, ya que fue el segundo compuesto en abundancia en las resinas estudiadas y se obtiene como subproducto en el proceso de aislamiento de α -amirina.

Las resinas de copal blanco Tepoztlan, Sonora, negro y piedra presentaron una banda de color café (R_f 0.25) correspondiente a α -amirina. La resina Elemi también contenía α -amirina, pero puesto que el color de la banda correspondiente al R_f del estándar no fue exactamente del mismo color, se puede deducir que no era el compuesto puro. Todas las resinas, excepto la Elemi contenían además, una banda de menor polaridad que fue identificada como *epi*-lupeol. Con respecto a las plantas analizadas, se adicionó también, una mezcla de α - y β -amirina (50%-50%), la cual se presentó como una banda homogénea de color violeta.

Los resultados obtenidos al desarrollar la cromatografía de capa fina, demostraron que de todas las muestras presentaban una mezcla de ambas amirinas, en diferentes proporciones (Fig.103).

Resultados y discusión

Para poder resolver la mezcla de α - y β -amirina por TLC, y posteriormente lograr su eventual aislamiento, se realizaron experimentos usando placas impregnadas con nitrato de plata. Esta metodología permite la separación de mezclas de ácidos grasos, ésteres de glicerol y triterpenos, así como de otros compuestos que presenten uno o varias insaturaciones (Li y col., 1995). En nuestro caso, se probaron diferentes concentraciones de nitrato de plata y condiciones de elusión, pero no se logró la separación de la mezcla de amirinas.

A pesar de no poder diferenciar por TLC entre la β -amirina y la mezcla α - y β -amirina, el análisis cualitativo de las muestras anteriores, permitió una selección inicial de las posibles fuentes de estos compuestos, permitiendo identificar las muestras que mayoritariamente contenían α -amirina.

3.10.2.- Análisis cuantitativo por HPLC de amirinas en resinas y plantas:

Para determinar y cuantificar las amirinas en los extractos hexánicos se desarrolló un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo el método descrito en el apartado 2.4.3.3. El cromatograma de la mezcla de los estándares α - y β -amirina, presentó dos picos bien definidos con tiempos de retención de 15,3 y 16,8 min, respectivamente (Fig. 34).

Para la obtención de la curva patrón, los estándares de los compuestos puros, a diferentes concentraciones, se analizaron por triplicado, y una vez obtenida la curva se procedió a analizar las muestras correspondientes de cada planta y de las resinas estudiadas. Las concentraciones se expresaron en mg/ml, y están representadas en la tabla 26.

Tabla 26-. Contenido de α - y β -amirina, determinado por HPLC, en las muestras de las plantas y resinas.

	β -amirina (mg/ml)	α -amirina (mg/ml)
copal blanco Tepoztlan	0,142	0,613
copal blanco Sonora	0,225	1,054
copal negro	0,180	0,565
copal piedra	0,102	0,423
resina Elemi	0,555	1,330
diente de león	0,519	0,178
olivo	0,008	0,042
cancerina	0,033	0,014
nanche	1,796	0,642
guayuca	0,553	1,382
caléndula	0,392	1,290

Si se relaciona la concentración de amirinas, respecto al peso del material vegetal, se puede determinar el material vegetal que presentaba mayor niveles de α -amirina o β -amirina (Fig. 104).

Resultados y discusión

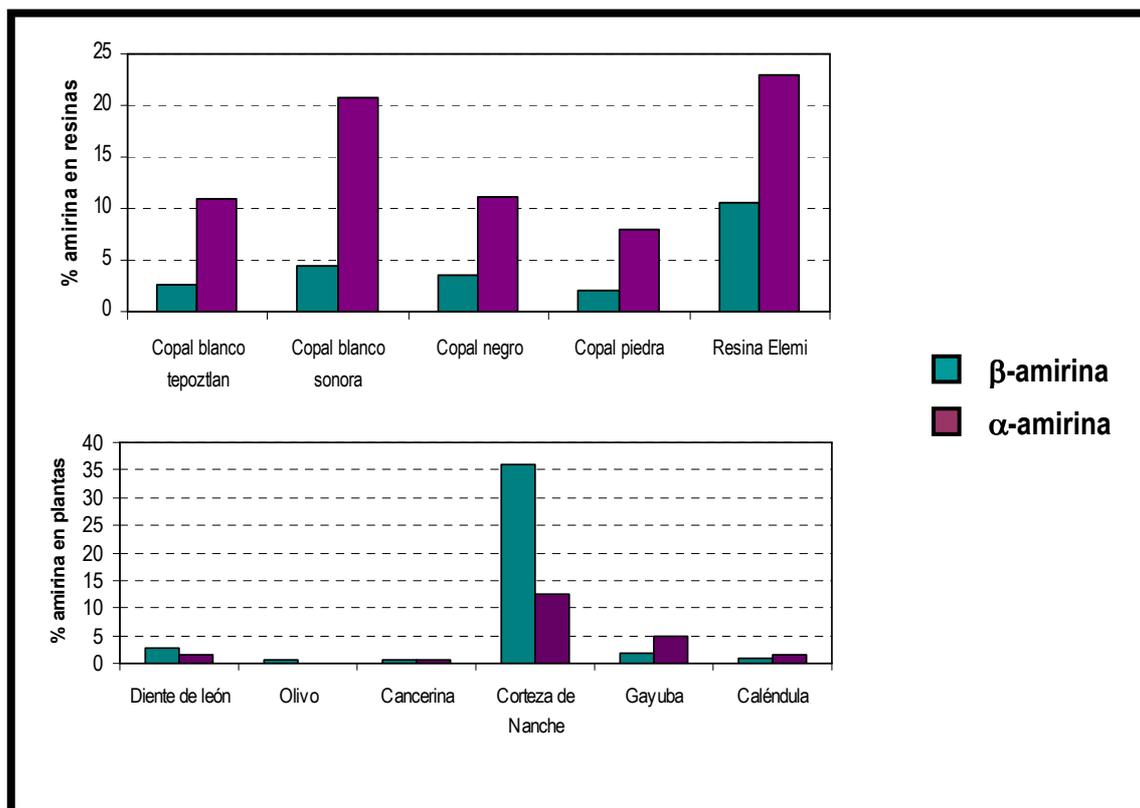


Figura 104-. Contenido de α - y β -amirina, expresados en porcentaje de peso seco, en los extractos de resinas y plantas estudiadas.

Los resultados de este estudio revelaron que la resina Elemi era el material que presentaba la mayor concentración de α -amirina, sin embargo, la proporción de α : β era de aproximadamente 2:1, lo que hizo que no fuera una candidata adecuada para obtener la α -amirina pura. La siguiente resina con mayor riqueza en α -amirina, es el copal blanco Sonora, la proporción en este caso era de casi 5:1 (α : β). Sin embargo esta resina contiene además de la mezcla de amirinas, el *epi*-lupeol de forma mayoritaria (>30%). La siguiente resina en contenido de amirinas es copal blanco Tepoztlán, presentando en este caso, una proporción de α : β similar a la anterior.

En cuanto a las plantas estudiadas, la gayuba y la corteza de nache son las que presentan mayor contenido de α -amirina, sin embargo, en niveles muy inferiores a los presentados en las resinas.

Los resultados comentados indican que las resinas copal blanco sonora y copal blanco de Tepoztlán pueden ser utilizadas como una fuente comercial de α -amirina, puesto que la proporción de α - es muy superior a la de β -, en ambos materiales.

La fuente mayoritaria de β -amirina es sin duda la corteza de nanche ya que, en este caso, la proporción de β : α amirina es de 3:1. En las otras plantas, sólo se encontraron pequeñas cantidades de β -amirina (< 5% del extracto). Por ello, esta planta fue seleccionada para el aislamiento de β -amirina.

3.10.3- Aislamiento cuantitativo de α - y β -amirina

Los resultados comentados en el apartado anterior, demuestran que el copal blanco Sonora, contenía niveles muy elevados α -amirina, pero también grandes cantidades de *epi*-lupeol, lo que dificultaba su purificación por TLC. Mientras que el copal blanco Tepoztlan, aunque no era la fuente mayoritaria de α -amirina, sí permitió el aislamiento cuantitativo de α -amirina, por sus menores contenidos en los otros triterpenos.

El copal blanco es la resina de la *Bursera odorata* o árbol del copal, una especie vegetal de origen americano, que se localiza en climas áridos y semiáridos (Fig. 105). Se caracteriza por almacenar agua en el tronco y ramas, lo que provoca que presenten formas tortuosas y nudosas, debido a estas reservas de líquidos.



Figura 105-. *Bursera odorata* o árbol del copal, del cual se obtiene una resina utilizada en ceremonias religiosas.

Es un árbol caducifolio, que puede alcanzar los 7 metros de altura, de hojas lanceoladas y la resina que se obtiene es muy aromática. Se introdujo en Europa después del descubrimiento de América, recibiendo vulgarmente el nombre de “copal”, y se ha usado en fumigaciones y sahumerios para “purificar el aire”. En medicina popular se utiliza para tratar dolores de cabeza, catarros y desmayos, o como ungüento para diferentes tipos de dolores; también ha sido utilizado en ceremonias religiosas como sustituto del incienso (López y Pardo, 1996). Recientemente, se

Resultados y discusión

ha demostrado la actividad bactericida contra el *Mycobacterium Tuberculosis* y citotóxica de la *Bursera odorata* y se continúa usando en ofrendas, en las ceremonias mortuorias y por su aroma, en aromaterapia (Murillo-Alvarez y col., 2001).

El aislamiento de α -amirina se realizó por cromatografía en capa preparativa, como se describe en el apartado 2.6.2 de Materiales y Métodos, obteniéndose un 10% de rendimiento de la resina cruda, con una pureza de 98,5% determinada por RMN de ^1H y comprobación de su punto de fusión.

La α -amirina fue utilizada para los posteriores ensayos de biotransformación, como sustrato y potencial precursor de los triterpenos de *C. asiatica*.

Como fuente natural de la β -amirina fue seleccionada la corteza de nanche. El nanche o *Byrsonima crassifolia* es un árbol de gran distribución en América, desde México hasta el norte de Brasil. Es un árbol perenne y heliófito de crecimiento rápido, valorado principalmente por sus frutos comestibles, ligeramente ácidos que se pueden consumir frescos o procesados (Fig. 106). También ha sido utilizado desde épocas pre-hispánicas por sus hojas y corteza como planta medicinal para tratar desordenes digestivos, infecciones de piel o como expectorante (Olivares y Peña, 2004).



Figura 106- *Byrsonima crassifolia* o nanche, en México es frecuentemente utilizada para el tratamiento de diarreas.

Resultados y discusión

La β -amirina fue obtenida por cristalización mediante disolventes del extracto hexánico de la corteza de nanche 4,5 g de resina (2% de PS), con una pureza de 72% determinada por RMN de ^1H . La primera cristalización del extracto metanólico de los residuos de nanche resultaron en cristales de 0,01 g de peso que contenían 82% de β -amirina y 18% de α -amirina (determinado por RMN de ^1H) (Fig. 107). Las sucesivas recristalizaciones no mejoraron la pureza de β -amirina. Posteriores purificaciones de los cristales por TLC- AgNO_3 preparativa tampoco fueron posibles. Por lo que este triterpeno pentacíclico, no pudo ser usado como precursor.

Considerando la importancia emergente de los triterpenos pentacíclicos α - y β -amirina, nuestros resultados son de interés para futuras investigaciones sobre el uso de diferentes metabolitos secundarios presentes en plantas y resinas para el mantenimiento de la salud humana. El procedimiento de TLC desarrollado, es un método simple y rápido para la determinación de triterpenos en plantas y resinas. El método de HPLC se ha demostrado adecuado para la cuantificación de α - y β -amirina en una matriz compleja como la resina de copal. Las técnicas de TLC-preparativa, TLC- AgNO_3 y la cristalización han sido probadas para el aislamiento y purificación de α - y β -amirina, de la resina de copal y de los residuos de nanche. Especialmente, los altos niveles de purificación de la α -amirina sugieren, que las resinas utilizadas podrían tener un uso comercial, como fuente de triterpenos.

Resultados y discusión

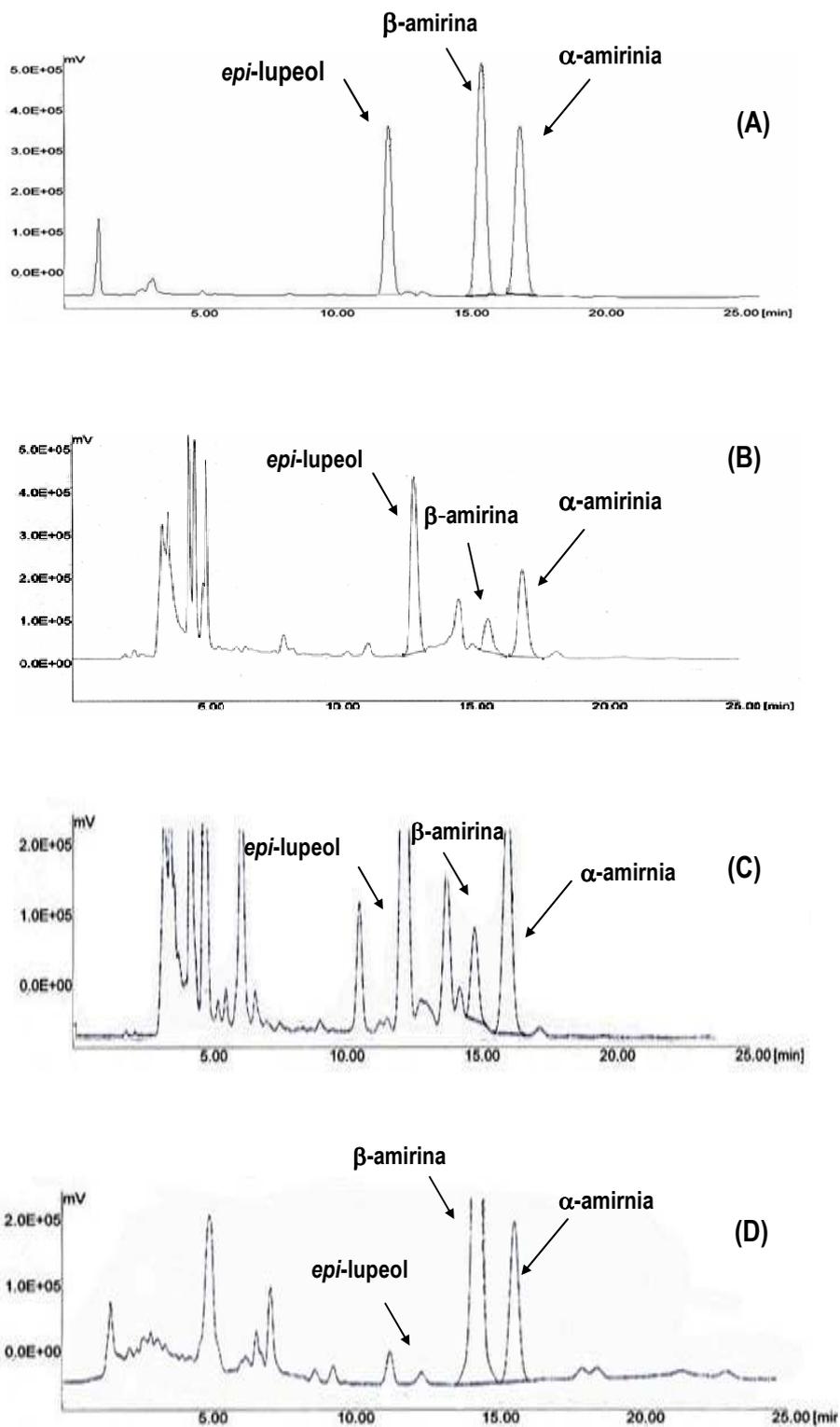


Figura 107.-Resultados de los análisis por HPLC. (A) Mezcla de patrones. (B) Cromatograma de la resina de copal Tepoztlan. (C) Cromatograma de la resina de copal Sonora. (D) Cromatograma de los residuos de nanche.

3.10.4-. Biotransformación del precursor α -amirina usando acetona como cosolvente. Efecto permeabilizador del DMSO

Como ya se ha indicado previamente (ver capítulo 1.2.2), los pasos específicos que llevan a la formación de centelósidos se desconocen actualmente, por ello, para seleccionar el sustrato adecuado para los ensayos de biotransformación, nos basamos en los siguientes motivos. La α -amirina es estructuralmente más similar a los centelósidos que la β -amirina (Fig. 108), de modo que su administración podría simplificar la biocatálisis de los intermediarios en las suspensiones celulares, y la α -amirina se consiguió aislar con mayor grado de pureza que la β -amirina, con lo cual, se simplificaba la interpretación de los resultados del estudio.

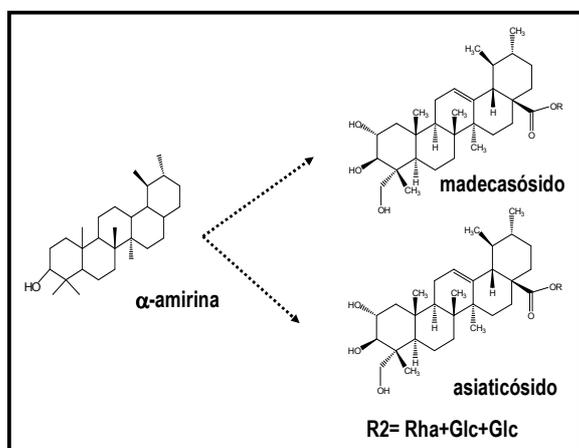


Figura 108-. Estructura de la α -amirina y las dos saponinas de interés de *C. asiatica* (madecacosido y asiaticosido).

Los primeros ensayos de biotransformación se iniciaron con la adición de 40 mg de α -amirina disuelta en 6 ml de acetona a los 10 días de cultivo, en 200 ml de medio MS + [2,4D (2 mg/l) + BA (0,1 mg/l)] con 20 g de células. Sin embargo, al cabo de poco tiempo de reacción, se observó la presencia de un precipitado de α -amirina, provocando la turbidez del medio. En ese momento, también era muy alta la densidad celular, por lo que se decidió reducir el tiempo de crecimiento celular, previo a la adición del precursor, a 7 días. Al repetir el experimento, en estas condiciones, nuevamente volvió a aparecer un precipitado de α -amirina y a la vez se produjo una elevada mortalidad de las suspensiones celulares tratadas.

Debido al descenso de viabilidad del cultivo y a la escasa disolución del sustrato, se evaluaron otras concentraciones de acetona y se probaron nuevos disolventes orgánicos, para lograr una mejor incorporación del precursor en las células y una mayor disolución del sustrato, puesto que la α -amirina presenta una baja solubilidad en agua. Previamente se habían realizado ensayos de biotransformación con células vegetales, adicionando sustratos apolares, disueltos en diferentes alcoholes orgánicos. Con la finalidad de determinar el disolvente más adecuado

Resultados y discusión

para la administración de α -amirina, se realizaron pruebas de solubilidad en diversos solventes (Tabla 27).

Tabla 27-. Ensayos de disolución de α -amirina (+ grado de solubilidad).

Disolvente	1 ml	2 ml	3 ml
Acetona	++	+++	++++
Acetato de etilo	++	+++	++++
Etanol	-	++	+++
Isopropanol	-	++	+++
Butanol	+	++	+++
DMSO	+	++	+++

De los resultados de la tabla 27 se desprende, que la acetona y el acetato de etilo son los mejores disolventes para α -amirina, sin embargo el uso del acetato de etilo para cultivos celulares no ha sido descrito, además, el acetato de etilo es un disolvente hidrofóbico lo que dificultaría su dispersión en el medio de cultivo.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de viabilidad con tres de los disolventes hidrofílicos acetona, etanol y butanol, para determinar la posible toxicidad de estos, para los cultivos celulares de *C. asiatica*. Los estudios se realizaron durante un período de 5 días, tomando muestras diariamente (Fig. 109-111).

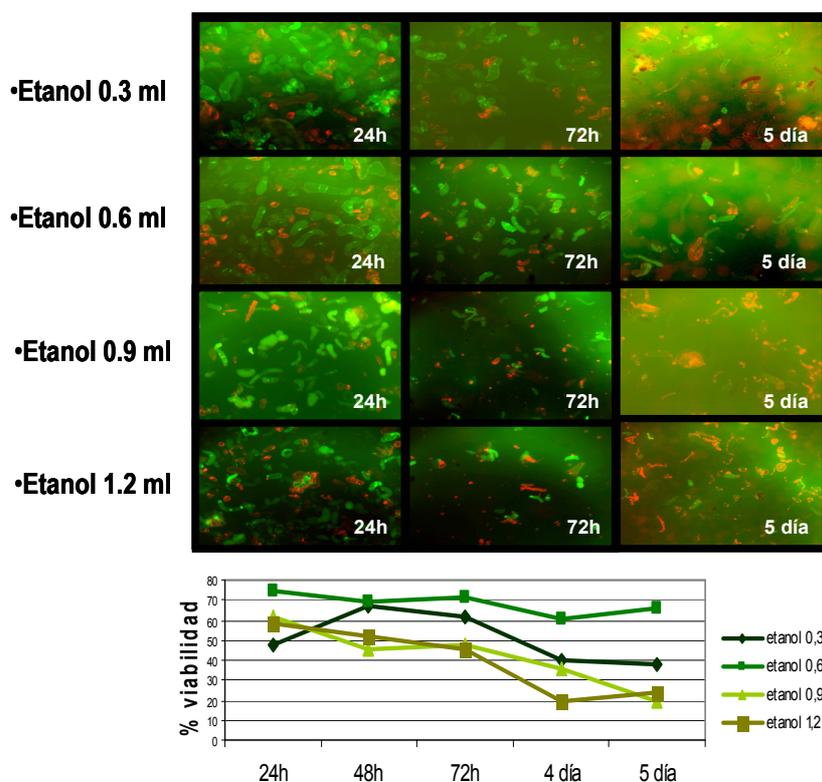


Figura 109-. Viabilidad celular de las suspensiones tratadas con diferentes cantidades de etanol.

Resultados y discusión

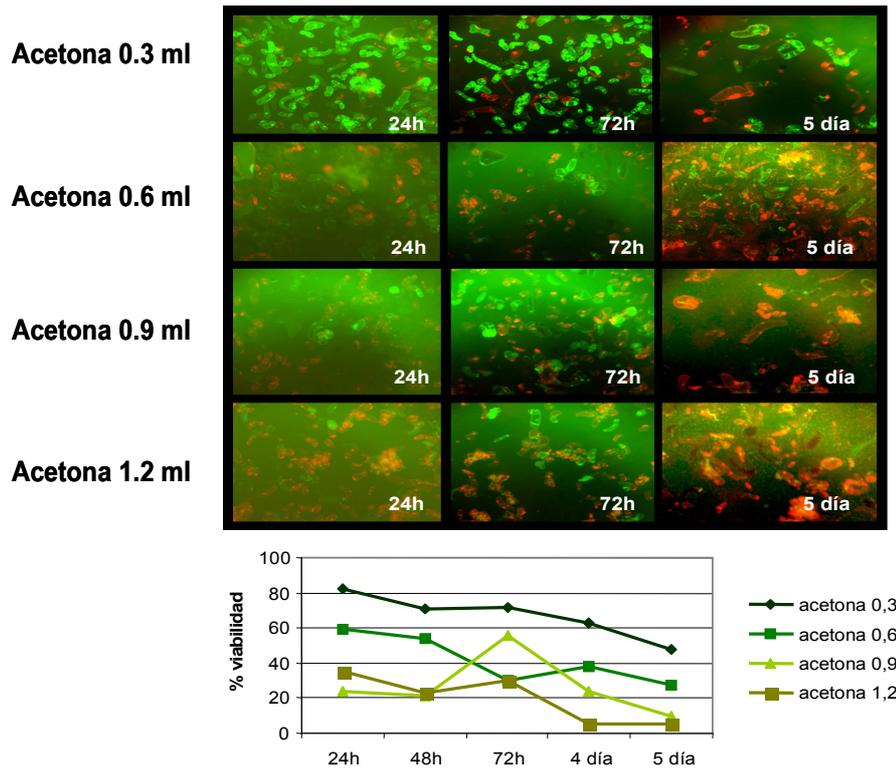


Figura 110-. Viabilidad celular de las suspensiones tratadas con diferentes cantidades de acetona.

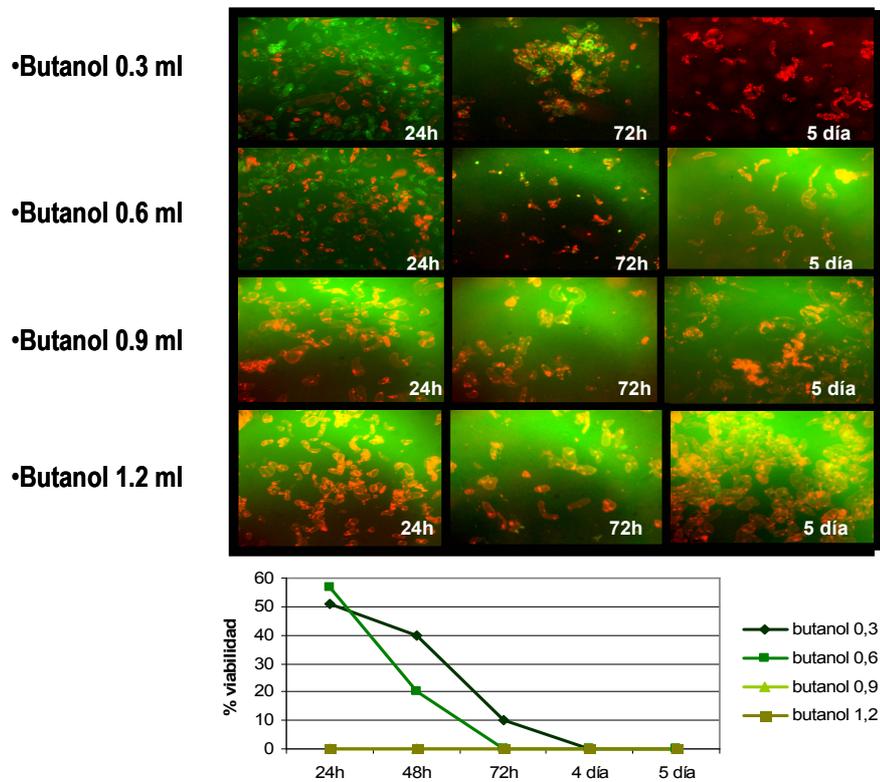


Figura 111-. Viabilidad celular de las suspensiones tratadas con diferentes cantidades de butanol

Resultados y discusión

La mayores tasas de viabilidad, a lo largo de los cinco días evaluados, se obtuvieron en los cultivos que se habían adicionado etanol, seguidos de los tratados con acetona, siendo el butanol el disolvente más tóxico para las células de *C. asiatica* (Fig. 109-111), ya que produjo un fuerte descenso de células vivas a las 24 h de tratamiento, y tras 72 h sólo un 20% de las células del cultivo se mantenían vivas, con el tratamiento a la menor concentración del disolvente, posteriormente la viabilidad se redujo al 0%, al final del tratamiento (Fig. 111).

Finalmente, se seleccionó la acetona como disolvente pues, a pesar de ser más tóxico que el etanol, disuelve mejor la α -amirina. Debido a la toxicidad del disolvente se tuvo que limitar la cantidad de α -amirina que se podía adicionar a los cultivos. Al administrar poco sustrato, y para asegurarnos que existía accesibilidad de éste, a las células, se adicionó también un agente permeabilizante a los cultivos celulares.

Muchos metabolitos secundarios, son productos intracelulares que se almacenan en las vacuolas de las células vegetales (Zhang y col., 2002), como ejemplo las betalainas, pigmentos presentes en plantas del orden de las *Caryophyllales* y ciertos hongos del género amanita, que son utilizados como colorantes en la industria alimentaria (Strack y col., 2003). Esto provoca, que en los procesos biotecnológicos, se utilicen diferentes estrategias para desestructurar las membranas celulares y lograr la liberación de los compuestos al medio de cultivo, estrategias como pueden ser la electroporación, la sonicación y la permeabilización mediante la utilización de agentes químicos (Brodelius, 1988). Estas técnicas permiten la fácil recuperación de los compuestos, con una disminución mínima de la viabilidad celular y de esta manera se puede reutilizar la misma biomasa, en un nuevo cultivo (Thimmaraju y col., 2003). La liberación de los metabolitos secundarios al medio de cultivo, durante el proceso de bioproducción, permitirá facilitar la recuperación y purificación del producto, y puede favorecer su propia biosíntesis, incrementándose el rendimiento del bioproceso (Zhang y col., 2002; Thimmaraju y col., 2003). En determinados casos, el acúmulo continuo de un principio activo en la célula, puede provocar la inhibición de los procesos de biosíntesis, debido a que la acumulación de producto puede inhibir enzimas claves de la ruta metabólica (Strack y col., 2003). En el caso de la producción de saponinas, se ha utilizado la ultrasonicación, en cultivos celulares de *Panax ginseng*. Este sistema también se ha utilizado en cultivos de *Litohspermum erythrorhizon* para obtener sikonina (Wu y Lin, 2003).

Algunos ejemplos de agentes químicos permeabilizantes son disolventes orgánicos, como el dimetil sulfóxido (DMSO), u otros compuestos como el quitosan y algunos detergentes (Dörnenburg y Knorr, 1992). Estos agentes provocarían la formación de pequeños poros en las membranas, por los cuales serían excretados los compuestos, de una manera temporal y sin

Resultados y discusión

dañar a la célula (Thimmaraju y col., 2003). En nuestro caso elegimos el DMSO, disolvente que ha sido utilizado previamente con éxito en biotransformaciones, usando cultivos de células vegetales (Kuruville y col., 1999). Ejemplo de ello, ha sido la permeabilización de células de *Catharanthus roseus* con DMSO a concentraciones de hasta 0,5% (v/v), mediante este sistema se consiguió la liberación de un 50% del total de alcaloides intracelulares (Park y Martinez, 1992). En suspensiones celulares de *Chenopodium rubrum* productoras de betacianinas, se obtuvo una liberación del 61,7%, mediante la adición al medio de cultivo de DMSO a concentraciones del 11% (v/v) y un tiempo de contacto de 2h. En este estudio, también se observó que tiempos superiores, provocaban una disminución drástica en la cantidad de pigmentos liberados, debido al efecto altamente tóxico del DMSO (Knorr y Berlin, 1987).

Experimentos anteriores de nuestro grupo, en los cuales se habían probado concentraciones elevadas de DMSO en cultivos celulares, demostraron que una concentración superior al 5% era tóxica para las células vegetales. Por ello, previamente se realizaron estudios de viabilidad celular con diversas concentraciones de DMSO inferiores al 5%, concretamente se probaron las concentraciones 0,625% - 1,25% - 2,5%.

La viabilidad de los cultivos control de *Centella asiatica* se sitúa normalmente entre un 80 – 100% de células vivas, por ello, aquellos tratamientos que redujeran drásticamente estas tasas de viabilidad se descartarían. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 112. La concentración más elevada de DMSO (2,5%) disminuía la viabilidad hasta el 60%, a los cuatros días. Mientras que la concentración de disolvente más baja (0,625) no alteraba significativamente las tasas de viabilidad del cultivo (Anexo tabla 28c; P-valor=0,65), en relación al control no tratado. En su conjunto, el estudio estadístico de los resultados demostró que existían diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla anexo 28a), donde el control y la concentración de 0,625 respondían de la misma manera, mientras el tratamiento que provocaba mayor disminución de la viabilidad fue el de 2,5% de concentración de DMSO. Por ello, se seleccionó una concentración intermedia, que estuviera entre el 0,625% y 1,25%, siendo la concentración de DMSO elegida de 1% de disolvente.

Resultados y discusión

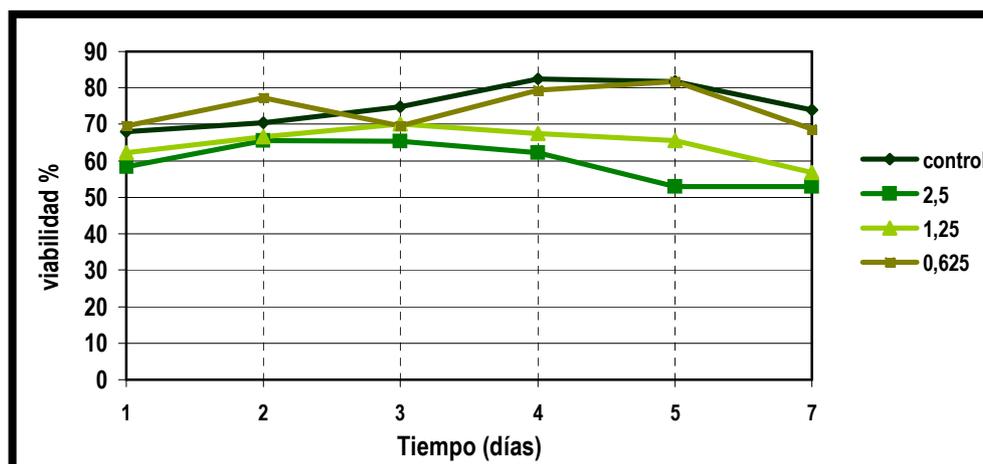


Figura 112-. Curso de viabilidad celular de *C. asiatica* al someter el cultivo a diferentes concentraciones de DMSO (0.625%-1.25%-2.5%).

El efecto negativo sobre la viabilidad celular de los permeabilizantes, podría deberse a la desnaturalización irreversible de las membranas celulares (Park y Martinez, 1992; Dörnenburg y Knorr, 1992; Bassetti y col., 1995). Brodelius en 1988, ya comprobó que la disminución de la viabilidad debida a la aplicación de los agentes permeabilizantes, era producto de la destrucción de la compartimentación celular, liberando componentes tóxicos y enzimas hidrolíticas, como proteasas, que actuarían sobre las proteínas presentes en la membrana plasmática.

López y col. (2007) trabajando en estudios de producción de anticuerpos recombinantes, con suspensiones celulares de *Nicotiana tabacum*, probaron la adición de dos concentraciones de DMSO, al 2,8% y al 5%, después de 14 días de cultivo y demostraron que la concentración más elevada del 5% provocaba un elevado efecto tóxico mientras que la de 2,8%, no afectaba de forma significativa a la viabilidad del cultivo. El descenso de la viabilidad iba acompañado por la liberación del anticuerpo al medio de cultivo. En suspensiones celulares de *Panax notoginseng* permeabilizadas con concentraciones DMSO de 1, 3 y 10%, también se pudo observar que la concentración más elevada provocaba la mayor inhibición del crecimiento celular (Zhong y col., 1997).

Los ensayos de biotransformación se realizaron adicionando 20 mg de α -amirina disuelta en 2 ml de acetona y DMSO a la concentración de 1% (v/v). Transcurridos 5 días, se procedió a analizar los extractos procedentes de células y medio de cultivo. En la figura 113, se puede observar los resultados del análisis cromatográfico por TLC de un extracto de acetato de etilo, obtenido a partir de los cultivos celulares. En la placa revelada, se observó la presencia de

Resultados y discusión

dos bandas correspondientes a compuestos nuevos que no estaban presentes en la muestra control, por lo que podrían tratarse de productos directos y abundantes de la biotransformación.

La α -amirina ya posee el núcleo del ursano (Fig. 8), presente en los centelósidos, por ello, los últimos pasos de esta ruta biosintética serían fundamentalmente hidroxilaciones y glucosidaciones que originarían una serie de intermediarios, entre los que podrían encontrarse los compuestos que originan las bandas nuevas de la Fig. 113.

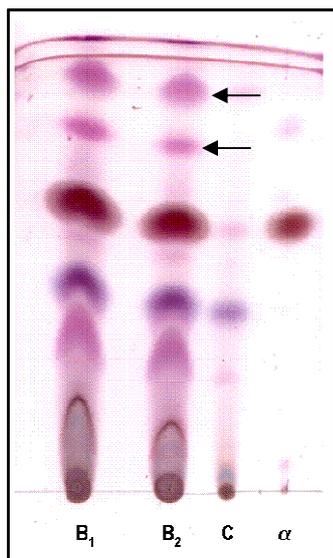


Figura 113-. Biotransformación de α -amirina en cultivos celulares de *C. asiatica*. α : patrón de α -amirina; C: control; B₁ y B₂: cultivos adicionados con α -amirina + DMSO + acetona. (→) Nuevos productos obtenidos por la biotransformación.

En los estudios de biotransformación, se analizaron por separado los contenidos de centelósidos de los cultivos adicionados de α -amirina, acetona y DMSO, de los cultivos control y de un cultivo control adicionado de acetona, para investigar también si este disolvente orgánico provocaba variaciones en la capacidad de producir y/o almacenar centelósidos. El estudio estadístico de los resultados (Anexo tabla 29b) mostró que la adición de acetona no provocaba diferencias significativas en la producción de centelósidos en relación al control (Fig. 114). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas entre el control y aquellas muestras tratadas con DMSO, y DMSO + amirina + acetona. En ambos caso, hubo un aumento significativo de la formación de centelósidos, siendo 7 veces superior en aquel proceso en que se había añadido el sustrato α -amirina. Además, la capacidad de los cultivos de liberar parte de los centelósidos sintetizados, también se vió incrementada significativamente (P-valor=0,000), en respuesta al agente permeabilizante (Fig. 114). Estos resultados parecen sugerir, que en la formación de centelósidos podrían operar mecanismos de retroalimentación, y por ello, la liberación de estos compuestos al medio de cultivo provocadas por el DMSO, podría suponer una estrategia para incrementar su producción, a la vez que, se favorecería la recuperación de los principios activos.

Resultados y discusión

Por otro lado, los altos niveles de centellósidos alcanzados en los cultivos adicionados de α -amirina (Fig. 114) demuestran la eficacia de las células de *C. asiatica* para biotransformar el sustrato en los productos finales y parecen sugerir que el flujo de carbono para la formación de estos principios activos no se encuentra limitado en los últimos pasos biosintéticos, sino, en la formación del núcleo del ursano, pues al suministrar este núcleo en forma de α -amirina a los cultivos celulares, rápidamente fue transformado en centellósidos.

A nivel individual, los ensayos de biotransformación incrementaron mayoritariamente los niveles de asiaticósido y madecasósido de los cultivos (Fig. 114), lo que corrobora que las reacciones de glucosidación, que se desarrollan en las últimas etapas del proceso biosintético, no limitan la formación *in vitro* de centellósidos.

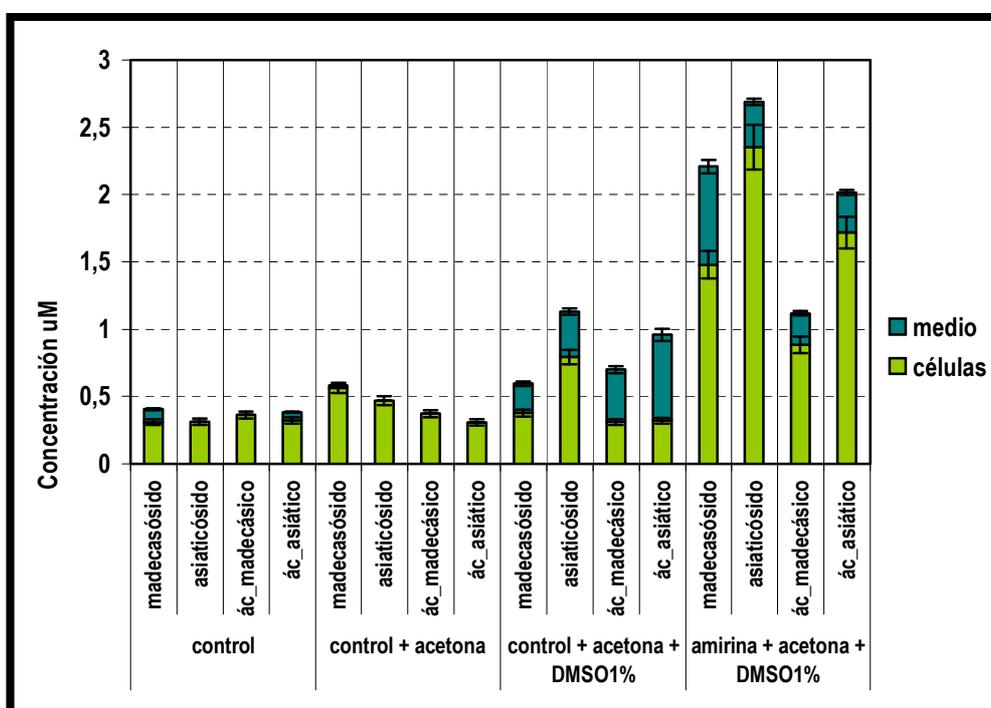


Figura 114-. Biotransformación de α -amirina en centellósidos. Ensayos con acetona y DMSO.

3.10.5-. Biotransformación de α -amirina usando β -ciclodextrina como transportador

Una alternativa al uso de disolventes y agentes permeabilizantes para la incorporación del sustrato, es la adición de ciclodextrinas. Como se ha descrito anteriormente (ver apartado 2.6.7), estos compuestos incrementan la solubilidad de las sustancias poco solubles en agua. Las ciclodextrinas son macrociclos formados por 4 o más unidades de azúcar. Estas moléculas, pueden formar complejos de inclusión con los sustratos lipofílicos y aumentar así su disolución

Resultados y discusión

en el medio, o bien incorporarlos a las células, para ser transformados. Además, a estos compuestos también se les atribuyó acción como elicitores (Zamboni y col., 2006).

Las proporciones en que se adicionan las ciclodextrinas en relación al sustrato son diversas. Por ejemplo, en la bioconversión de isoeugenol en vainillina se utilizó una relación 1:1 (Rao y Ravishankar, 1999), 2:1 para resveratrol (Morales y col., 1998) y 3:1 para la formación de esteroides (Lu y col., 2007). Estructuralmente, las amirinas son similares a estos últimos compuestos, por ello, se decidió realizar los estudios de transformación mediada por β -ciclodextrina, con la relación de sustrato de 3:1. Sin embargo, en ensayos preliminares, no se llegó a disolver completamente toda la α -amirina en esta proporción de ciclodextrina, por ello, se optó por añadir separadamente la β -ciclodextrina y la α -amirina disuelta en acetona, como anteriormente se había probado en los ensayos con el permeabilizante DMSO (ver apartado 3.10.4).

La β -ciclodextrina tiene la capacidad de formar cuerpos de inclusión con diversos compuestos, de forma que actuaría como un vehículo de transporte hacia el interior de la célula. Nuestros resultados parecen confirmar que también pueden actuar de forma similar a un agente permeabilizante (Fig. 115), puesto que los cultivos tratados con ciclodextrina, presentaron niveles de centelósidos en el medio de cultivo significativamente superiores (Anexo tabla 30; P-valor=0.0006), al cultivo control.

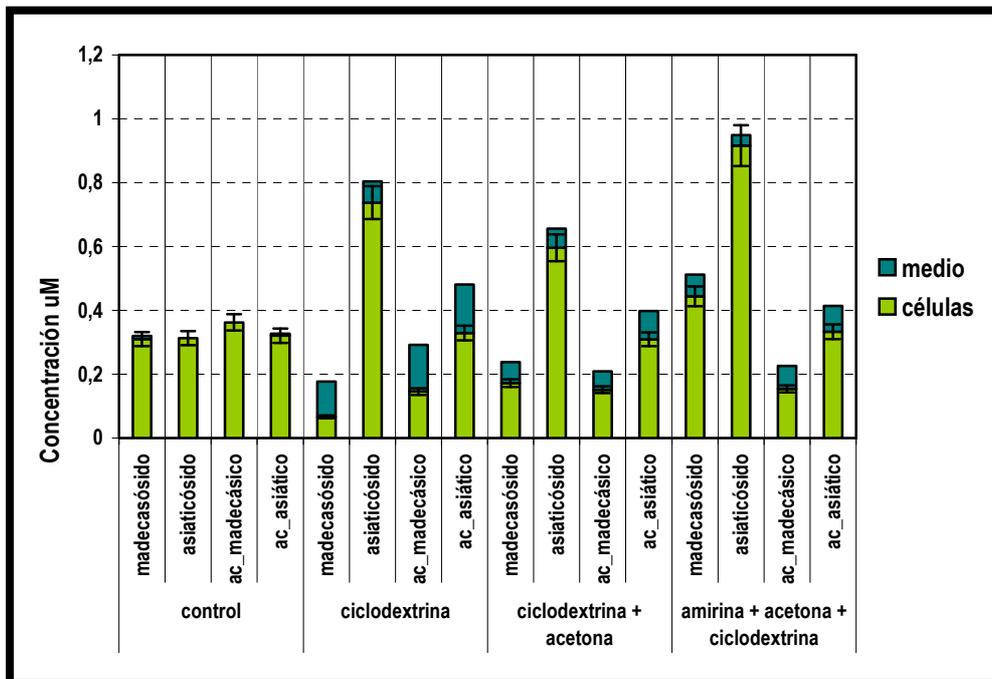


Figura 115-. Biotransformación de α -amirina en centelósidos, en cultivos celulares adicionados con β -ciclodextrina.

Resultados y discusión

En el caso de suspensiones celulares de *C. asiatica*, también se observó un aumento en la producción total de saponinas (Fig. 116), lo que parece corroborar este efecto elicitor, ahora bien, si se tiene en cuenta que parte de las saponinas formadas en respuesta a ciclodextrina fueron liberadas al medio, nuestros resultados también podrían sugerir que la ciclodextrina actúa como un mero permeabilizante provocando una respuesta similar a la del DMSO.

Finalmente, nuestros resultados demuestran que la adición conjunta de β -ciclodextrina y α -amirina a los cultivos celulares de *C. asiatica*, en ausencia de un agente permeabilizante, incrementó significativamente los niveles de centelósidos de los cultivos, a la vez de aumentar también su liberación al medio de cultivo (Fig. 116). Estos resultados indican, que la β -ciclodextrina estaría actuando como un vehículo de transporte para los compuestos, es decir podría trasladar la α -amirina al interior de las células para que fuera convertida en centelósidos. Simultáneamente, los compuestos formados como resultado de la biotransformación podrían ser liberados al medio de cultivo, mediante un sistema facilitado por la ciclodextrina.

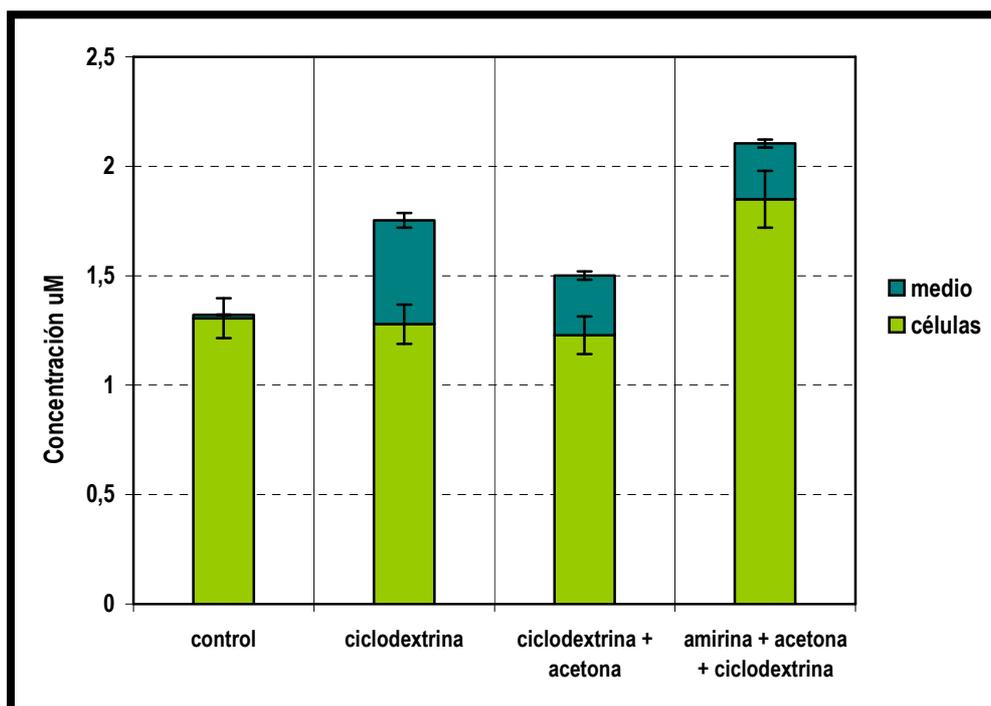


Figura 116-. Efecto de la β -ciclodextrina y α -amirina sobre la producción total de centelósidos en las suspensiones celulares.

Aunque los últimos pasos de la biosíntesis de centelósidos son desconocidos, el hecho de que tanto, en la biotransformación mediada por DMSO, como en la mediada por β -ciclodextrina, se produjeran unos niveles más elevados de asiaticósido que de madecasósido, en relación con los cultivos control (Fig. 115), parece indicar una limitación de las células de *C. asiatica* para

Resultados y discusión

hidroxilar la posición 6 del anillo del ursano, la única diferencia estructural entre ambos compuestos (Fig. 108). Por otro lado, el hecho de que los niveles de las geninas ácido asiático y ácido madecásico fuera siempre inferior a la de las respectivas saponinas, asiaticósido y madecasósido (Fig. 115), también parece sugerir que las glucosidaciones que se producen en los últimos pasos de la biosíntesis de estos compuestos no son restrictivas y los incrementos de ácido asiático y ácido madecásico producidos en respuesta a la adición del precursor α -amirina fueron rápidamente convertidos en los respectivos glucósidos.

Por otro lado, si se comparan las tasas de bioconversión logradas en las biotransformaciones de α -amirina en centelósidos, utilizando como agente permeabilizante el DMSO, con los sistemas en que se utilizó la β -ciclodextrina, nuestros resultados parecen indicar la idoneidad de utilizar el tratamiento con DMSO. En este caso, de la α -amirina administrada, un 15,7 % fue absorbida por las células vegetales y transformada en centelósidos con una eficiencia del 15%. Estos valores aunque bajos, son comparables con resultados previos obtenidos también con células vegetales. Recientemente, Moyano y col. (2007) informaron de la transformación de hiosciamina en escopolamina, en cultivos celulares de tabaco, llegando a tasas de bioconversión de hasta un 17,7%, en un sistema optimizado.

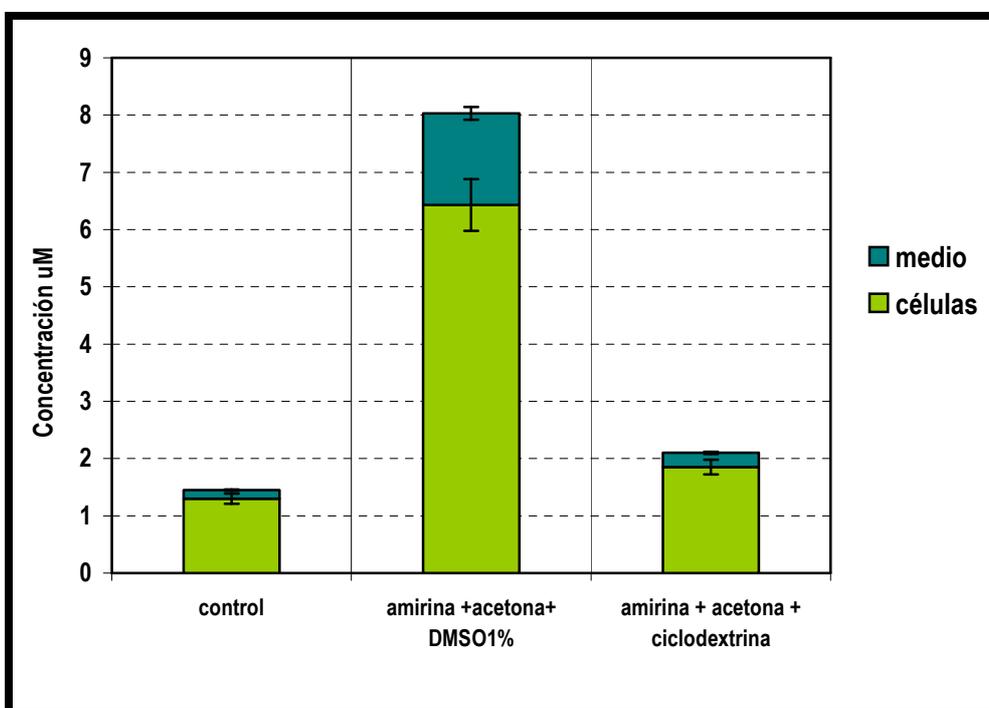


Figura 117-. Producción total de centelósidos en las biotransformación con DMSO y ciclodextrina.

Resultados y discusión

Estos resultados, también se confirman en términos de producción total, pues los cultivos tratados con DMSO y α -amirina acumularon hasta 3,8 veces más centellósidos que aquellos tratados con β -ciclodextrina y α -amirina (Fig. 117).