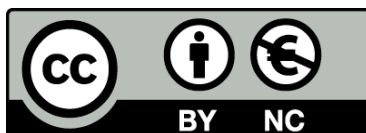




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Influencia de las auxinas giberelina GA3 y fenobarbital sobre la síntesis de cardenólidos en cultivos de callo de *Digitalis Purpurea* L.

M^a Mercedes Bonfill Baldrich



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License**.

TESIS DOCTORAL

M^a MERCEDES BONFILL BALDRICH

**INFLUENCIA DE LAS AUXINAS, GIBERELINA GA₃ Y FENOBARBITAL
SOBRE LA SINTESIS DE CARDENOLIDOS EN CULTIVOS DE CALLO
DE *DIGITALIS PURPUREA* L.**



Barcelona, 1993

"BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA"



0700084097

X

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

**INFLUENCIA DE LAS AUXINAS, GIBERELINA GA, Y FENOBARBITAL
SOBRE LA SINTESIS DE CARDENOLIDOS EN CULTIVOS DE CALLO
DE *DIGITALIS PURPUREA* L.**

Memoria presentada por M^a MERCEDES BONFILL BALDRICH para optar al
Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Barcelona.

Trabajo realizado en la Unidad de Fisiología Vegetal de la
Facultad de Farmacia (Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal Sanitaria y
Edafología) bajo la dirección de la Dra. CARMEN MORALES PUJOL
y la Dra. ROSA M^a CUSIDO VIDAL.

Programa de Doctorado: Biología Vegetal. Productos Naturales.

Bienio: 87/88.

Tutor: Dra. M^a Teresa Piñol Serra.

A mis padres.

A mis hermanos.

**El placer que acompaña la ciencia
pone en olvido la fatiga.**

Horacio

**La ciencia no consiste en hechos,
sino en las consecuencias que de
ellos se obtienen.**

Claude Bernard

Quiero expresar mi agradecimiento:

A la Dra. Carmen Morales Pujol, Catedrática de Biología vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona y directora de esta tesis, por su efectiva dirección y el apoyo que en todo momento me ha prestado.

A la Dra. Rosa M^a Cusidó Vidal, Profesora Titular de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona y directora de esta tesis, por su valiosa orientación y su inestimable ayuda.

A la Dra. M^a Teresa Piñol Serra, Catedrática de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, por las facilidades que me ha ofrecido para la realización de este trabajo.

Al Dr. Javier Palazón Barandela, Profesor Titular de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, por su desinteresada colaboración y sus sugerencias.

A los demás colegas del Departamento, y en especial a la Dra. Teresa Altabella Artigas, a la Dra. M^a Dolors Solsona Flotats, a José Antonio Fuente Ylla y a todos aquellos que han cooperado en la realización de esta tesis.

A la Dra. Conchita Arenas del Departamento de Bioestadística de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona por sus orientaciones sobre el tratamiento estadístico de los resultados.

A los miembros del Departamento de Microscopía electrónica de la Universidad de Barcelona por proporcionarme el material necesario para el estudio de la ultraestructura.

A todos mis amigos, y en particular a Consuelo Guijarro Ramonet pues sin su participación mi trabajo se hubiera visto más limitado.

A mi familia, por su constante apoyo: todos ellos, de un modo u otro, han hecho posible que esta tesis se llevara a cabo.

ABREVIATURAS

A.	= área
ABS	= absorción
Ac	= anticuerpo
Ag	= antígeno
AHH	= arilhidrocarburo (benzo[a]pireno) hidroxilasa
ANOVA	= análisis de la varianza
C ₂	= medio de inducción
CFY	= células formadoras de yemas
CI	= células indiferenciadas
conc.	= concentración
Cuadr	= cuadrados (estadística)
DAG	= diacilglicerol
EDTA	= ácido etilendiaminotetracético
EGB	= estructuras globulares blancas
EGV	= estructuras globulares verdes
ELISA	= inmunoensayo ligado a enzimas
EPR	= propiedades paramagnéticas de los electrones
F	= estadístico de Fisher-Snedecor
Fp	= flavoproteína
g	= gravedad
Grd.	= grados (estadística)
GT ₁	= glutathion transferasa
Ho	= hipótesis nula

H ₁	= hipótesis positiva
IC-LAH	= hidroxilasa de la cadena del ácido láurico
ISP	= proteína ferrosulfúrica
IUB	= Unión internacional de Bioquímica
2iP	= N ⁶ -[2-isopentenil] adenina
ω-LAH	= ácido láurico ω-hidroxilasa
(ω-1)-LAH	= ácido láurico (ω-1)- hidroxilasa
Lib.	= libertad (estadística)
med.	= medios
MeOH	= metanol
micros.	= microsomales
mitoc.	= mitocondriales
MS	= medio de cultivo de Murashige y Skoog
NMOR ₁	= NAD(P)H menadiona oxidoreductasa
P450	= citocromo P450
P450cam	= citocromo P450 bacteriano
P450scc	= complejo enzimático responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol
Pb	= fenobarbital
pCMA	= p-cloro-N-metilanilina
PF	= peso fresco
PKC	= proteínquinasa C
POD	= peroxidasa
prot.	= proteínas
PS	= peso seco
r	= coeficiente de correlación

R = coeficiente de correlación múltiple (estadística)

RIA = radioinmunoensayo

SD = desviación estándar

TCDD = 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

U = unidad enzimática

UV = ultravioleta

X = media aritmética

α = nivel de significación (estadística)



INDICE

I. INTRODUCCION

1. CONSIDERACIONES GENERALES	1
2. <i>DIGITALIS PURPUREA</i> L.	2
2.1. Breve historia de la planta	2
2.2. Descripción y habitat	4
2.3. Cultivo, recolección y desecación	5
2.4. Composición química de la planta	7
3. METABOLISMO SECUNDARIO	10
3.1. Apreciación global	10
3.2. Genética y enzimología	11
3.3. Regulación del metabolismo secundario	14
4. CARDENOLIDOS	16
4.1. Origen de los cardenólidos	16
4.2. Estructura química de los cardenólidos	16
4.3. Funciones y mecanismo de acción	17
4.4. Biosíntesis de cardenólidos	21
4.4.1. Formación del núcleo esteróidico a partir del ácido mevalónico.	22
4.4.2. Construcción del anillo butenólidos por condensación de un derivado del pregnano con una molécula de acetato.	27
4.4.3. Glucosidación con una cadena no ramificada de más de cuatro (deoxi) azúcares en el C-3.	28
4.5. Regulación de la biosíntesis de cardenólidos	29
4.5.1. Factores externos:	
Luz	29
Temperatura	31
Nutrientes	31

	Equilibrio hormonal	33
	Otros factores externos	36
	Xenobióticos:Fenobarbital	37
4.5.2. Factores internos:	Factores genéticos	40
	Factores morfológicos	41
	Citocromo P450	41
	A) Generalidades	41
	B) Nomenclatura sistemática	44
	C) Características	45
	D) Componentes del sistema	47
	E) Diversidad de reacciones catalizadas	51
	F) Diversidad de mecanismos catalíticos	53
	G) Diversidad de mecanismos reguladores.Inductores e inhibidores.	58
	H) Sistema citocromo P450 en las plantas. Funciones	64
	Citocromo P450sc	70
4.6. PRODUCCION DE CARDENOLIDOS		72
4.6.1. <i>in vivo</i>		72
4.6.2. <i>in vitro</i>		76
4.6.2.1. Cultivos <i>in vitro</i> :		76
Características		76
Variabilidad genética		77
Cultivo <i>in vitro</i> para la obtención de productos secundarios:		
Particularidades		80
Biotransformación		81
Utilidad de los cultivos <i>in vitro</i>		87
4.6.2.2. Organogénesis:		89
Relación organogénesis-síntesis de productos secundarios		89
Inducción de la organogénesis		90
Regeneración		92

II.MATERIAL Y METODOS

1. CULTIVO DEL TEJIDO DE CALLO	103
1.1. Obtención de los explantes	104
1.2. Medios de cultivo	104
1.3. Inducción del tejido de callo	105
1.4. Subcultivo inicial	108

2. RECOJIDA DE MUESTRA	111
3. MEDIDA DEL CRECIMIENTO	112
3.1. Determinación del Peso fresco	112
3.2. Determinación del Peso seco	113
4. CONTENIDO EN PROTEINAS Y CITOCROMO P450 DE LAS FRACCIONES MICROSOMAL Y MITOCONDRIAL	113
4.1. Método de extracción de las fracciones microsomal y mitocondrial	113
4.1.1. Extracción de membranas	115
4.1.2. Separación de las fracciones mitocondrial y microsomal	115
4.2. Determinación de las proteínas por el método de Bradford	117
4.2.1. Fundamento y método	117
4.2.2. Reactivos utilizados	117
4.2.3. Cálculos	119
4.3. Determinación del citocromo P450	119
4.3.1. Fundamento y método	119
4.3.2. Cálculos	120
5. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS	121
5.1. Definición de unidad enzimática	122
5.2. Sistema generador de NADPH	122
5.3. Valoración de la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa	123
5.3.1. Fundamento y método	123
5.3.2. Reactivos utilizados	124
5.3.3. Cálculo del coeficiente de extinción del citocromo c y linealidad de las absorbancias	124
5.3.4. Cálculos	125
5.4. Determinación de la actividad del complejo enzimático P450 _{scc}	126
5.4.1. Fundamento y método	126
5.4.2. Reactivos utilizados	127
5.4.3. Cálculos	128
6. DETERMINACION DE CARDENOLIDOS	128
6.1. Método de extracción de cardenólidos	129
6.2. Determinación de cardenólidos totales	131
6.2.1. Fundamento y método	131
6.2.2. Cálculos	131
6.3. Determinación de Digitoxina	131
6.3.1. Fundamento y método	133
6.3.2. Reactivos utilizados	135
6.3.3. Cálculos	135

7. ESTUDIO HISTOLOGICO Y DE LA ULTRAESTRUCTURA	137
7.1. Reactivos utilizados	137
7.2. Preparación de la muestra	137
7.3. Obtención de los cortes semifinos para el estudio histológico	138
7.4. Obtención de los cortes ultrafinos para su estudio en el microscopio electrónico	139
7.5. Análisis morfométrico	139
7.5.1. Concepto de Estereología	139
7.5.2. Principios estereológicos	141
7.5.3. Mediciones	141
8. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS	143
8.1. Análisis de la varianza	143
8.2. Regresión lineal múltiple	145

III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA	147
1.1. Morfología externa	147
1.2. Estudio histológico	155
Medios AIA	155
Medios ANA	155
1.3. Estudio de la ultraestructura	161
Consideraciones generales para cada medio	162
Comparaciones entre los medios	163
Análisis morfométrico	163
1.4. Conclusiones generales	165
Efecto de la Giberelina GA ₃	165
Efecto del Fenobarbital	165
Otras observaciones	166
2. CRECIMIENTO	175
2.1. Peso fresco	175
2.1.1. Medio AIA	175
2.1.1.1. Adición de Giberelina GA ₃	175
2.1.1.2. Adición de Fenobarbital	175
2.1.1.3. Adición conjunta de Giberelina GA ₃ y Fenobarbital	175
2.1.2. Medio ANA	175
2.1.2.1. Adición de Giberelina GA ₃	175
2.1.2.2. Adición de Fenobarbital	176
2.1.2.3. Adición conjunta de Giberelina GA ₃ y Fenobarbital	176
2.1.3. Análisis de la varianza de los Pesos frescos	176
2.1.4. Comparaciones múltiples para contrastar las semanas de crecimiento (Bonferroni)	178

2.1.5. Comparaciones múltiples para contrastar los medios (Bonferroni)	183
2.1.6. Discusión	196
2.2. Peso seco	197
2.2.1. Medio AIA	197
2.2.1.1. Adición de Giberelina GA ₃	197
2.2.1.2. Adición de Fenobarbital	197
2.2.1.3. Adición conjunta de Giberelina GA ₃ y Fenobarbital	197
2.2.2. Medio ANA	198
2.2.2.1. Adición de Giberelina GA ₃	198
2.2.2.2. Adición de Fenobarbital	198
2.2.2.3. Adición conjunta de Giberelina GA ₃ y Fenobarbital	198
2.2.3. Análisis de la varianza de los pesos secos	198
2.2.4. Comparaciones múltiples para contrastar las semanas de crecimiento (Bonferroni)	199
2.2.5. Comparaciones múltiples para contrastar los medios (Bonferroni)	204
2.2.6. Discusión	218
3. CONTENIDO EN PROTEINAS Y CITOCROMO P450	219
3.1. Proteínas de la fracción mitocondrial	219
3.1.1. Observaciones sobre los distintos medios	219
3.1.2. Análisis de la varianza de las proteínas de la fracción mitocondrial	219
3.1.3. Comparaciones múltiples para contrastar las semanas de crecimiento (Bonferroni)	220
3.1.4. Comparaciones múltiples para contrastar los medios (Bonferroni)	225
3.1.5. Discusión	235
3.2. Citocromo P450 mitocondrial	238
3.2.1. Medio AIA	238
3.2.2. Medio ANA	238
3.2.3. Análisis de la varianza del contenido en citocromo P450 mitocondrial	239
3.2.4. Comparaciones múltiples para contrastar las semanas de crecimiento (Bonferroni)	240
3.2.5. Comparaciones múltiples para contrastar los medios (Bonferroni)	245
3.2.6. Discusión	255
3.3. Proteínas de la fracción microsomal	258
3.3.1. Medio AIA	258
3.3.2. Medio ANA	258
3.3.3. Análisis de la varianza de las proteínas de la fracción microsomal	259
3.3.4. Comparaciones múltiples para contrastar las semanas de crecimiento (Bonferroni)	260
3.3.5. Comparaciones múltiples para contrastar los medios	

(Bonferroni)	265
3.3.6. Discusión	275
3.4. Citocromo P450 microsomal	278
3.4.1. Medio AIA	278
3.4.2. Medio ANA	278
3.4.3. Análisis de la varianza del contenido en citocromo P450 microsomal	279
3.4.4. Comparaciones múltiples para contrastar las semanas de crecimiento (Bonferroni)	280
3.4.5. Comparaciones múltiples para contrastar los medios (Bonferroni)	285
3.4.6. Discusión	294
4. ACTIVIDADES ENZIMATICAS	298
4.1. Actividad NADPH-citocromo P450 reductasa	298
4.1.1. Medio AIA	298
4.1.2. Medio ANA	298
4.1.3. Análisis de la varianza de la actividad NADPH-citocromo P450 reductasa	299
4.1.4. Comparaciones múltiples para contrastar las semanas de crecimiento (Bonferroni)	300
4.1.5. Comparaciones múltiples para contrastar los medios (Bonferroni)	305
4.1.6. Discusión	315
4.2. Actividad del complejo enzimático responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol	319
4.2.1. Medio AIA	319
4.2.2. Medio ANA	319
4.2.3. Análisis de la varianza de la actividad del complejo enzimático responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol	320
4.2.4. Comparaciones múltiples para contrastar las semanas de crecimiento (Bonferroni)	321
4.2.5. Comparaciones múltiples para contrastar los medios (Bonferroni)	326
4.2.6. Discusión	335
5. CARDENOLIDOS	339
5.1. Cardenólidos totales	339
5.1.1. Medio AIA	339
5.1.2. Medio ANA	340
5.1.3. Análisis de la varianza de los cardenólidos totales	340
5.1.4. Comparaciones múltiples para contrastar las semanas de crecimiento (Bonferroni)	341
5.1.5. Comparaciones múltiples para contrastar los medios (Bonferroni)	346
5.1.6. Análisis de la varianza para conocer el medio más productivo	

en cardenólidos	356
5.1.7. Discusión	357
5.2. Digitoxina	362
5.2.1. Medio AIA	362
5.2.2. Medio ANA	363
5.2.3. Análisis de la varianza de la Digitoxina	362
5.2.4. Comparaciones múltiples para contrastar las semanas de crecimiento (Bonferroni)	364
5.2.5. Comparaciones múltiples para contrastar los medios (Bonferroni)	369
5.2.6. Análisis de la varianza para conocer el medio más productivo en Digitoxina	379
5.2.7. Discusión	379
6. REGRESION LINEAL MULTIPLE	384
IV. CONSIDERACIONES FINALES	389
V. CONCLUSIONES	393
VI. BIBLIOGRAFIA	395

PRESENTACION Y OBJETIVOS

La biosíntesis de los compuestos secundarios está normalmente restringida a estados particulares del desarrollo e integrada en un programa específico de diferenciación; por ello, la producción de dichos metabolitos mediante cultivos *in vitro* resulta en muchos casos difícil si no se dan previamente las condiciones de diferenciación adecuadas. Un claro ejemplo de la necesidad de diferenciación morfológica previa a la diferenciación química la tenemos en la obtención de cardenólidos, puesto que únicamente los cultivos en los que se manifiesta, al menos, a nivel subestructural una diferenciación, son capaces de formar estos principios activos.

La producción de estos compuestos mediante cultivos de tejido de callo o cultivos de células en suspensión o inmovilizadas no ha logrado ni tan siquiera igualar los niveles de cardenólidos producidos por la planta intacta. Este hecho se debe probablemente a que la síntesis y/o activación de los sistemas enzimáticos que participan en los caminos metabólicos que llevan a la formación de dichos compuestos requiere un grado de diferenciación celular; y también a que se desconocen las señales externas responsables del desbloqueo de los genes propios del metabolismo secundario, genes que a menudo son inactivos en los cultivos *in vitro* a pesar de que la información genética se halla siempre intacta.

No obstante, este tipo de cultivos tiene interés porque, entre otras ventajas, permite un mejor control de los parámetros unificando así el contenido en principios activos, sobretodo en plantas que, cultivadas de forma tradicional como las *Digitalis*, presentan cambios graduales en la composición de los glucósidos cardiotónicos que son debidos a los diversos estados de desarrollo de la planta y a factores ambientales.

Por todo ello en este trabajo, utilizando callos de *Digitalis purpurea*, pretendemos estudiar la producción de cardenólidos:

1) Activando aquellos pasos del metabolismo que se hallan bloqueados, para lo cual añadimos Fenobarbital al medio de cultivo; el Fenobarbital es un efector químico que, como es sabido, activa ciertos procesos enzimáticos dependientes de citocromo P450; y además añadimos Giberelina GA₃, uno de cuyos efectos más conocidos es activar la formación del retículo endoplasmático.

2) Provocando un grado de diferenciación morfológica adecuado mediante la aplicación de dos auxinas diferentes y una citoquinina al medio de crecimiento, manteniendo una relación auxina/citoquinina adecuada y bajo condiciones constantes de luz y temperatura.

De este modo pretendemos colaborar con el avance de las investigaciones actuales sobre la mejora de la bioproducción de cardenólidos en *Digitalis purpurea* mediante cultivos *in vitro*, analizando a su vez algunos factores que pueden influir sobre la organogénesis en tejido de callo y sobre la regulación de la biosíntesis de cardenólidos en los mismos.

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

1. CONSIDERACIONES GENERALES

El hombre, a lo largo de la historia, ha utilizado gran cantidad de plantas, aún ignorando sus verdaderas cualidades farmacológicas, para aliviar o curar sus enfermedades. Los conocimientos empíricos de la antigüedad, se completaron con estudios fitoquímicos que nos dieron a conocer los principios activos vegetales.

Las plantas poseen rutas metabólicas, comunes o similares a las de todos los seres vivos por las cuales sintetizan y utilizan compuestos orgánicos (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos) que son totalmente imprescindibles para poder realizar su ciclo ontogénico; estas rutas constituyen el metabolismo primario y los compuestos indicados reciben el nombre de metabolitos primarios.

Sin embargo, las plantas poseen además otras rutas metabólicas que conducen a la formación de compuestos no totalmente imprescindibles para la vida del vegetal pero útiles para su adaptación e interacción con el medio; son las rutas del metabolismo secundario, a cuyos productos, los metabolitos secundarios, las plantas deben, generalmente, sus propiedades farmacológicas.

De entre las plantas farmacológicamente activas destaca el género *Digitalis* por sus propiedades específicas sobre el corazón. Sus principios activos más utilizados son productos del metabolismo secundario, denominados cardenólidos, entre los que sobresalen la digitoxina y la digoxina por su acción prácticamente insustituible en la insuficiencia cardíaca congestiva y ciertas arritmias.

FIGURA I-1

Planta de *Digitalis purpurea* crecida en el invernadero.



2. DIGITALIS PURPUREA L.

2.1. BREVE HISTORIA DE LA PLANTA

La primera referencia sobre el uso medicinal de la *Digitalis* aparece en 1250 en un manual farmacéutico en el que se habla de una fórmula hecha con hojas de "foxglofa" (dedalera) para tratar cefaleas.

INTRODUCCION

Más tarde, en un libro de 1466, se encontró que los Caballeros Teutónicos utilizaban un parche hecho con hojas de dedalera para curar heridas, un remedio lógico atendiendo a las propiedades vasoconstrictoras de la planta.

Parece que el término *Digitalis* se menciona por primera vez en "*De historia stirpium commentarii*" publicada por Leonard Fuchs en 1542 y es la primera descripción que se hace de la planta. En 1546 Hieronymus Bock, en un libro impreso en Estrasburgo, propone el uso de las hojas de dedalera no solo para aplicación local sino también en forma de píldora. Desde entonces esta droga aparece en la mayoría de los libros de terapia.

En 1650 se inscribe por primera vez en la Farmacopea de Londres (Font Quer, 1962) y en 1733 Lemery publica el "Dictionnaire des drogues simples" en el que describe la *Digitalis purpurea* indicando su utilidad en la hidropesía.

Pero la historia, sobre todo, ha unido la *Digitalis* al nombre de William Withering (1741-1799) y su libro "An account of the foxglove and some its medical uses with practical remarks on dropsy and the other diseases", publicado en 1785, en el que describe 163 casos fruto de sus observaciones médicas a lo largo de diez años, y 53 casos a él relatados (Withering, 1785). Ya anteriormente, en 1776, había publicado la primera edición de su botánica en la que escribía: "La *Digitalis purpurea* merece más atención que la que le presta la práctica médica. Yo aún no la he introducido en la prescripción común".

De hecho Withering no descubrió esta droga, más bien dió una clara y concisa disertación sobre sus indicaciones, métodos de administración, dosis y peligros. Con todo, estaba convencido de que actuaba directamente contra la hidropesía y aunque sabía de su influencia sobre el corazón no se percató de que ésta era la responsable del papel beneficioso sobre aquella enfermedad (Ducheme, 1991).

Manchester John Ferriar en 1799 empezó a resaltar sus efectos sobre el corazón y en Francia Bidault de Villers publicó en agosto de 1802 un ensayo en el que hacía incapié sobre la eficacia de la planta para las enfermedades cardíacas.

Johannes Evangelista Purkinje (1787-1869) anotó la modificación que ejerce esta planta sobre el ritmo del corazón. En 1845 se aisló por primera vez un material cristalino, impuro pero activo, que poseía mayoritariamente digitoxina. Se le llamó "digitalina" y fué utilizada en medicina con la misma eficacia que las hojas de Digital.

En 1864 el farmacéutico A. Nativelle fué el primero en obtener un material más puro que la "digitalina" llamado "digitalina cristalizada", éste era el principal glucósido cardiotónico presente en las hojas de *Digitalis purpurea*; pero hasta 1928 no fué establecida la estructura correcta de este glucósido debido a su complejidad química. La determinación de la misma se debe a A. Windawski y col., por lo que le fué concedido el premio Nobel de química ese mismo año.

2.2. DESCRIPCION Y HABITAT

La *Digitalis purpurea* es una planta bianual o vivaz. Durante el primer año forma una roseta de hojas; en el segundo año crece un tallo de 50cm a 1m de altura que en lugares muy propicios puede llegar a alcanzar 2m. Florece de mayo a junio según la altitud de su habitat (Figura I-1).

Las hojas están sostenidas por un peciolo que se acorta hasta desaparecer en las superiores; son grandes, de forma variable, generalmente entre aovada y lanceolada, con los

FIGURA I-2

Aspecto de las flores de *Digitalis purpurea* L.



INTRODUCCION

bordes festonados, dentados o casi enteros; pero siempre son blandas, con la nervadura realizada y a menudo vellosas en el envés.

Las flores forman un racimo unilateral en la sumidad del tallo, son grandes, de 3 a 5cm, tubulosas, dilatadas y ventradas en la mitad superior de la corola, con dos labios poco manifiestos, de color púrpura y manchas más intensas en la parte dilatada del tubo, generalmente orladas de blanco (Figura I-2). El cáliz se halla profundamente dividido en cinco sépalos de forma tan variable como las hojas. Tienen cuatro estambres de los cuales una pareja es más corta que la otra. Su fórmula floral es: K (5), C (5), A (4) didínamo, G (2). El fruto es una cápsula ovalada, bilocular, y contiene numerosas y diminutas semillas.

Las plantas de *Digitalis purpurea* crecen en bosques claros de encinas y alcornoques; también junto a robles, hayas y abetos así como entre rocas y peñascos de montañas silíceas o descalcificadas. Precisan para su supervivencia elevada humedad ambiental, por ello se encuentran ampliamente distribuidas en la mitad occidental del país (Figura I-3).

También en Europa se halla muy extendida pudiéndose encontrar en las Islas Británicas, Francia, Austria, Suiza, Alemania, y ocasionalmente en el norte y este de Dinamarca (Rose, 1987).

2.3 CULTIVO, RECOLECCION Y DESECACION

La cantidad y la composición de la mezcla de cardenólidos en las especies de *Digitalis* varían ampliamente con los factores botánicos, geográficos y ecológicos de las plantas.

Incluso en aquellos países donde la abundancia de plantas de *Digitalis* en estado silvestre cubre las propias necesidades, y aún prescindiendo de su posible importación, su cultivo controlado puede resultar interesante con objeto de unificar el contenido en principios activos.

El cultivo de la Digital se establece en suelo silíceo, suelto y permeable, en lugar elevado, con ambiente húmedo y soleado. Requiere un abonado a base de sales potásicas (sulfato o cloruro), así como sulfato amónico y superfosfatos. En general dichos abonos aumentan la cosecha de hojas, pero el clima, y sobre todo las horas de sol, aumentan la riqueza en principios activos. Se cultiva fácilmente a partir de semillas (Font Quer, 1962). El porcentaje de germinación es máximo en suelos ricos en materia orgánica, y además en ellos la planta alcanza gran altura, seguidos por suelos arcillosos (Imtiaz-ul-Haq, 1991).

Los principios activos contenidos en la hoja de Digital varían mucho durante las 24h. del día. La mayor cantidad se acumula en las horas de sol y alcanza el máximo por la tarde, decreciendo a continuación debido a que la propia planta destruye los glucósidos formados



FIGURA I-3

Distribución geográfica de la *Digitalis purpurea* y sus subespecies en la Península Ibérica e islas Baleares.



y produce sustancias más simples, las cuales se transforman y metabolizan en otros órganos de la planta. Al amanecer, las hojas carecen total o casi totalmente de principios activos.

Por consiguiente la recolección se hará durante las primeras horas de la tarde, y se recolectarán las hojas inferiores más sanas y enteras, cuando ya se han empezado a abrir algunas flores. Se recomienda desdenar las hojas más viejas de la parte externa de la roseta basal, y las de la parte alta del tallo (Font Quer, 1962).

En las hojas recién recolectadas se produce espontáneamente una fermentación autolítica que va hidrolizando los glucósidos primarios a secundarios (Sellwood, 1956), sobre todo si la desecación se efectúa lentamente o se utiliza una temperatura superior a los 50°C (Font Quer, 1962). Para asegurar la hidrólisis enzimática en una cosecha, Sellwood propone someter las hojas frescas de *Digitalis purpurea* a 37°C en agua durante 72h.; otros autores

INTRODUCCION

utilizan el secado al aire de las hojas, debidamente protegidas, durante 6 u 8 semanas, lográndose también en este caso la hidrólisis completa de los glucósidos primarios debido al largo proceso de secado (Tantivatana y Wright, 1958).

Sin embargo, según Neuwald (1952), en la hoja no hay enzimas capaces de efectuar la hidrólisis de los glucósidos secundarios a aglicones (Sellwood, 1956).

En otras ocasiones interesará detener estos procesos enzimáticos estabilizando las hojas. Respecto al procedimiento a seguir no todos los autores opinan lo mismo; algunos las someten a vapor de pineno, componente principal de la esencia de trementina; otros realizan una rápida desecación con aire bien seco que actúe en ambas superficies de la hoja; si se hace uso de la calefacción la temperatura no debe rebasar los 40° a 50°C (Font Quer, 1962).

Se ha demostrado que hojas frescas de *Digitalis* recién recolectadas producen cantidades muy pequeñas de desglucoglicósidos (glucósidos secundarios) si se extraen sin permitir la degradación enzimática (Tantivatana y Wright, 1958), y la proporción de aglicones presentes en muestras de hojas de *Digitalis purpurea* es muy pequeña (Kaiser, 1966). Khafagy y Girgis (1974) estudiaron tres métodos de secado en hojas de *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata* para cuantificar la conversión de glucósidos primarios a secundarios; concluyeron que el mejor método de secado, de los tres ensayados, para evitar estas conversiones es la liofilización, seguida por el método en corriente de aire a 55-60°C durante 8 horas y por el de secado, también en corriente de aire, a 20°C durante 5 o 6 días.

Para su uso comercial las plantas de *Digitalis* crecen a gran escala a partir de semillas que germinan fácilmente (Europa: Holanda y Hungría; USA; Sudamérica: Argentina; Asia y Africa), a la vez que se requieren técnicas especiales para lograr estas cosechas (Rücker, 1988).

2.4 COMPOSICION QUIMICA DE LA PLANTA

Las hojas de *Digitalis purpurea*, como hemos indicado anteriormente, son fuente de importantes productos secundarios, entre los que destacan:

1) Sustancias esteroídicas :

A) **Glucósidos cardiotónicos:** *Purpurea* glucósidos A y B y glucogitaloxina (glucósidos primarios), que al perder la molécula de glucosa forman **digitoxina**, **gitoxina** y **gitaloxina** respectivamente (glucósidos secundarios). Si la descomposición hidrolítica se produce en medio ácido cada molécula de glucósido secundario pierde tres moléculas de digitoxosa dando como producto los aglicones respectivos: **digitoxigenina**, **gitoxigenina** y

gitaloxigenina.

También están presentes la **acetildigitoxina** y los **mono y bis digitoxósidos** de cada uno de los glucósidos secundarios (Font Quer, 1962; Rücker, 1988).

En las semillas se halla otro glicósido, la **digitalina**, que en pequeña cantidad aparece también en las hojas.

B) Espirostanoles (saponinas esteroídicas) como la digitonina y la gitonina, y sus respectivos aglicones digitogenina y gitogenina.

C) Digitanol glucósidos (esteroides C₂₁ libres de N) (Tschesche, 1972): diginigenina, digifologenina, digipurpurogenina (Tschesche y col, 1964) y digacetigenina (Tschesche, 1966).

D) Fitosteroles.

2) Otros compuestos: Flavonas, antraquinonas y ác.orgánicos.

No se ha encontrado sin embargo digoxina, que junto a la digitoxina está presente en *Digitalis lanata*.

Como es sabido, los glucósidos cardiotónicos son metabolitos bioactivos de gran importancia económica que se utilizan en la industria farmacéutica como fuente natural de sustancias con propiedades cardiotónicas; actualmente el uso de la digitoxina y la digoxina así como también de otros glucósidos cardiotónicos, provenientes de las distintas especies de *Digitalis*, está ampliamente difundido (Balandrin y Klocke, 1988; Salisbury y Ross, 1991). En la Tabla I-1 pueden observarse los productos de origen vegetal más importantes actualmente.

RESULTADOS Y DISCUSION

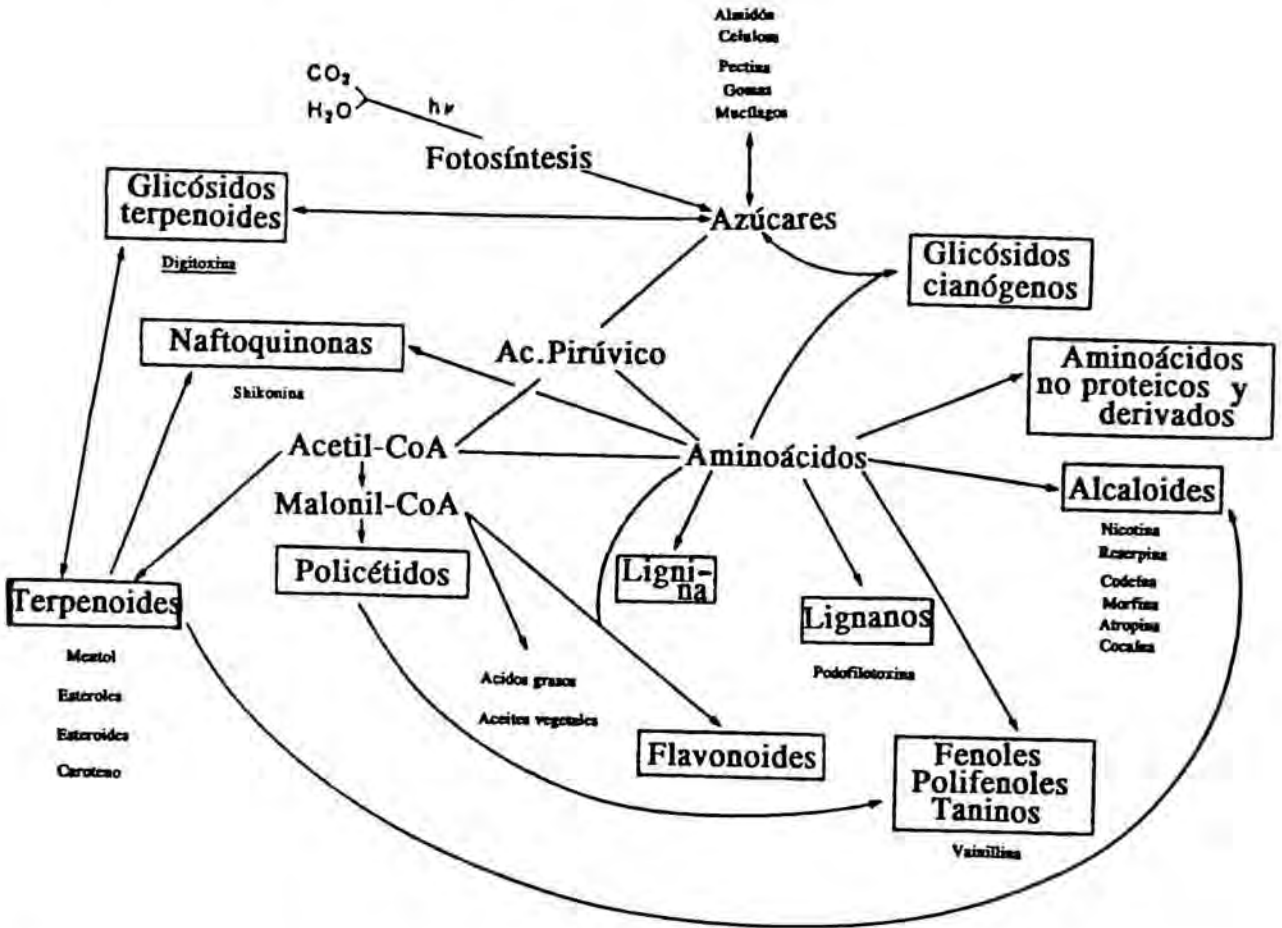
TABLA I-1

Productos de origen vegetal importantes económicamente,
con indicación de su acción terapéutica y principales
especies que los producen.

PRODUCTOS	ORIGEN	ACCION TERAPEUTICA
Esteroides		
Glicósidos (Digoxina, Digitoxina)	<i>Digitalis lanata</i> <i>Digitalis purpurea</i>	Cardiotónicos
Hormonas (derivadas de la Diosgenina, Estigmasterol,...)	<i>Dioscorea spp.</i>	Contraceptivos
Alcaloides		
Atropina, Escopolamina, Codeína, Morfina	<i>Atropa belladonna</i> <i>Datura stramonium</i> <i>Papaver somniferum</i>	Anticolinérgicos Analgésicos
Reserpina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Antihipertensivo
Pilocarpina	<i>Pilocarpus spp.</i>	Colinérgico
Colchicina	<i>Colchicum autumnale</i>	Contra la gota
Cocaína	<i>Erythroxylon coca</i>	Anestésico local
d-Tubocurarina	<i>Strychnoa spp.</i> <i>Chondodendron tomentosum</i>	Relajante muscular
Quinina, Quinidina	<i>Cinchona spp.</i>	Antimaláricos Antiarrítmicos
Fisostigmina	<i>Physostigma venenosum</i>	Colinérgico
Vincristina, Vinblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	Anticanceroso

FIGURA I-4

Origen biosintético de algunos compuestos de interés comercial derivados de las plantas (los grupos principales de metabolitos secundarios aparecen encuadrados).



3. METABOLISMO SECUNDARIO

3.1. APRECIACION GLOBAL

Tal como hemos mencionado, las plantas además de su metabolismo primario, fundamental para la vida, poseen rutas metabólicas que llevan a la formación de compuestos derivados biosintéticamente de los metabolitos primarios, y que son propios de cada grupo

INTRODUCCION

taxonómico (especie, género, familia o grupo de familias estrechamente relacionadas); dichos compuestos, no imprescindibles para la vida del vegetal pero sí útiles para su adaptación o interacción con el medio, se conocen como metabolitos secundarios y todos los caminos metabólicos involucrados en su síntesis y/o transformación constituyen el llamado metabolismo secundario (Figura I-4).

Debido a que los metabolitos secundarios derivan biosintéticamente de los primarios y que sus precursores también se utilizan para la biosíntesis de ciertos compuestos primarios (ácidos grasos, proteínas, etc.), los dos tipos de metabolismo se encuentran ampliamente interconectados, haciéndose muy difícil establecer una división entre ambos.

Variaciones en las rutas metabólicas primarias pueden conducir a la formación de metabolitos secundarios. Así, la ruta de las pentosas-fosfato que origina los metabolitos primarios glucosa y fructosa, es a la vez fuente de los azúcares poco frecuentes encontrados en los glucósidos cardiotónicos.

Los metabolitos secundarios, como tales, no son estrictamente esenciales para la planta, pero a menudo poseen una significación ecológica importante en relación al comportamiento de la planta con su entorno, puesto que participan en la supervivencia conjunta del vegetal. Pueden servir para facilitar la polinización, para adaptar a la planta frente a las agresiones del entorno, como defensa y protección contra los microorganismos, insectos, hervíboros y hasta contra otras plantas (herbicidas naturales). También otros compuestos secundarios tienen importancia fisiológica (por ejemplo, los esteroides son constituyentes de las biomembranas o el polímero estructural lignina); por ello, los metabolitos secundarios, son por definición compuestos biológica y fisiológicamente activos.

Las características más importantes de los compuestos secundarios son:

- Heterogeneidad en sus estructuras químicas.
 - Distribución restringida.
 - Los enzimas que intervienen en su síntesis están codificados por un material genético especial.
 - Control estricto de su biosíntesis por regulación de la cantidad y actividad de enzima.
 - Compartimentación de los enzimas, precursores, intermediarios y productos involucrados en la biosíntesis, almacenamiento y degradación.
 - Expresión del metabolismo secundario como un aspecto de la diferenciación celular.
- Dependencia de los estadios de desarrollo del organismo productor.
- No tienen importancia para la célula que los sintetiza pero sí pueden tenerla para el organismo productor.

3.2. GENETICA Y ENZIMOLOGIA

Es conocida la existencia de un material genético propio para el metabolismo secundario, susceptible de regulación transcripcional, postranscripcional, traduccional y

INTRODUCCION

postraduccion, por factores que en muchos casos pueden estar influenciados por el medio ambiente. El DNA involucrado en el metabolismo secundario probablemente deriva del responsable del metabolismo primario, por duplicación de genes que han seguido una evolución divergente. La duplicación de estos genes y la evolución de las copias nuevamente formadas parece ser la base de la formación de nuevas vías alternativas a las ya existentes. Esta hipótesis se ha formulado porque existen pruebas experimentales que demuestran una gran similitud estructural entre enzimas relacionados del metabolismo primario y secundario (Luckner, 1984).

Sin embargo, después de comprobado este principio, se observó la existencia de las mismas sustancias complejas en organismos que no están relacionados, en estos casos parece muy improbable que se haya dado una evolución paralela del material genético necesario. Por ejemplo, los alcaloides de la ergolina se encuentran en varios hongos y también en Convolvulaceas. Es del todo imposible que exista una evolución paralela del material genético en grupos tan distantes. Por ello, lo probable es que el material genético, se haya trasladado de un grupo a otro, vía fusión de protoplastos, o por plásmidos o fagos u otros vectores genéticos como los parásitos simbiotes; dichas posibilidades equivaldrían sin duda a una ingeniería genética natural (Krauspe, 1982; Chilton, 1983; Gheysen y col, 1985).

Esta hipótesis pudo probarse estudiando el crecimiento de las agallas, excrecencias que son el resultado de una infección bacteriana. En ellas existe una transferencia de material genético que codifica productos secundarios específicos de una célula procariota a otra célula eucariota de la planta superior. En este caso se han encontrado pruebas de la transferencia del material genético; pero en otros casos no ha sido posible encontrarlas. Sin embargo, es probable, que también exista la cesión entre grupos distintos de organismos de material genético que condiciona la formación de metabolitos secundarios, y la aceptación de este material puede suponer una ventaja para el individuo y como consecuencia los genes se integran y se propagan.

Se cree que una parte relativamente elevada del genoma vegetal está implicada en la formación de los productos secundarios, por lo que su manipulación mediante la actual biotecnología puede dar lugar a cambios cualitativos y cuantitativos en la bioproducción de compuestos secundarios.

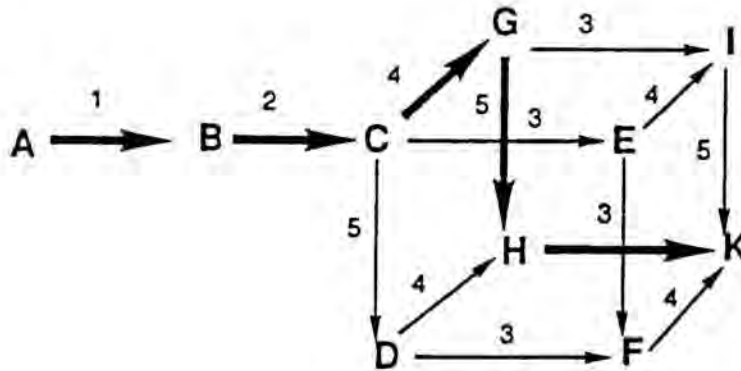
Actualmente se pueden considerar tres grandes grupos de genes responsables de la existencia de un metabolismo secundario vegetal:

- a) Genes estructurales que codifican enzimas metabólicos u otras proteínas directamente relacionadas.
- b) Genes reguladores que controlan la expresión de los genes estructurales.
- c) Genes cuyos productos controlan la síntesis y los flujos de precursores y cosustratos o que facilitan la acumulación y/o excreción de productos secundarios.

Una mutación en los genes estructurales inactiva los enzimas del metabolismo secundario debido a una alteración en la secuencia de aminoácidos. También, aunque es

FIGURA I-5

Esquema de una red metabólica. 1 y 2 son enzimas con alta especificidad por el sustrato. 3, 4 y 5 son enzimas de baja especificidad.



menos frecuente, un cambio en la estructura de los genes impide la síntesis de una determinada proteína enzimática. En los dos casos el camino correspondiente queda bloqueado.

La mayoría de las reacciones del metabolismo secundario están catalizadas por enzimas, conociéndose muy pocos casos de reacciones espontáneas, salvo en la formación de polímeros de alto peso molecular (por ejemplo ligninas y ácidos húmicos), o en algunos procesos de ciclación. En los últimos años se han aislado y caracterizado numerosos enzimas del metabolismo secundario, y se ha podido comprobar que son similares a aquellos propios del metabolismo primario, pues son estereoespecíficos, catalizan los mismos tipos de reacciones, muestran cinéticas similares, tienen semejante afinidad por sustratos e inhibidores y poseen una regulación de su actividad catalítica parecida. Probablemente esto se debe a que el material genético propio del metabolismo secundario deriva del primario.

Los enzimas que participan en las rutas biosintéticas propias del metabolismo secundario se pueden dividir en dos grupos según su especificidad por el sustrato:

- 1) Enzimas que intervienen en la formación del esqueleto básico de los metabolitos secundarios, y que poseen una elevada especificidad por el sustrato.
- 2) Enzimas que catalizan las modificaciones del esqueleto básico (deshidrogenasas, monooxigenasas, metiltransferasas, glucosiltransferasas). y que poseen una relativamente baja

especificidad por el sustrato. Esto da lugar a las llamadas redes metabólicas, de las que pueden surgir diversas sustancias que con frecuencia forman familias de compuestos (Figura I-5).

No hay pruebas de que los enzimas del metabolismo primario intervengan en las rutas del metabolismo secundario; tampoco de que la afinidad por el sustrato sea inferior para los enzimas del metabolismo secundario y para aquellos que facilitan el transporte de sustratos del metabolismo primario al secundario. (Luckner, 1984). Parece demostrado que los enzimas del metabolismo primario deben quedar saturados antes de iniciar su actividad los del metabolismo secundario; por estas razones, se ha llegado a la conclusión de que enzimas, precursores y productos intermediarios, se encuentran perfectamente compartimentados y que los dos grupos de enzimas se nutren de distintos conjuntos de precursores; por ello, las concentraciones locales de reaccionantes dependen del transporte directo de precursores, intermediarios y productos. La compartimentación hace posible la separación de los metabolitos secundarios de los intermediarios energéticos del metabolismo primario; también explica la acumulación de cantidades tóxicas de sustancias sin que causen daño al citoplasma celular. Es destacable el hecho de que la compartimentación de los metabolitos secundarios no se hace en espacios particulares distintos a los existentes en todas las células, sino que los orgánulos se adaptan a las necesidades de este metabolismo. Esto demuestra la flexibilidad de la organización espacial de las células y refleja la correlación entre el metabolismo primario y secundario (Luckner, 1980).

El microambiente de los enzimas del metabolismo secundario también juega un papel importante en la regulación y dirección de este metabolismo, así, por ejemplo los cambios en los lípidos de membrana son decisivos en la actividad de los enzimas (Stafford, 1981).

Uno de los hechos más característicos de los enzimas en ambos metabolismos es su estereoespecificidad. En las reacciones que generan o implican un centro quiral, sólo se produce o transforma uno de los enantiómeros. Esta estereoespecificidad se rompe por la estructura quiral de la proteína enzimática (lugares de unión y transformación del sustrato). La estereoespecificidad no se limita a reacciones en las que es evidente la configuración química del sustrato y del producto, sino que en centros que no son quirales las reacciones son, en la mayoría de los casos, también estereoespecíficas.

3.3. REGULACION DEL METABOLISMO SECUNDARIO.

La expresión del metabolismo secundario, es uno de los hechos más importantes en el control de la formación de productos secundarios y viene dado por la integración de los pasos metabólicos en los programas de diferenciación y desarrollo que son característicos de todas las células vivientes.

INTRODUCCION

Estos programas se caracterizan por la coexpresión de diferentes campos de células especializadas en varios aspectos del metabolismo secundario y en la síntesis de los enzimas que llevan a cabo sus pasos.

La organización estructural de las células y sus orgánulos es un factor importante en la regulación del metabolismo celular, originando la base de la compartimentación enzimática y el transporte vectorial de precursores, intermediarios y productos hacia los lugares de actividad metabólica. En el metabolismo secundario, la localización intracelular de enzimas y rutas metabólicas también está estrictamente controlada, lo cual conduce a :

- síntesis ordenada de productos secundarios a partir de intermediarios y cosustratos procedentes del metabolismo primario
- alta concentración local de precursores e intermediarios
- transporte dirigido de precursores e intermediarios, favoreciendo ciertas secuencias de reacciones
- acumulación de elevadas concentraciones de metabolitos en el exterior o el interior celular
- liberación controlada de los productos secundarios almacenados
- transformación y degradación controlada de los compuestos secundarios formados.

Las células productoras de metabolitos secundarios no presentan orgánulos nuevos, pero algunas estructuras se adaptan a los requerimientos específicos de este metabolismo, presentando una cierta especialización. Este hecho demuestra la flexibilidad de la organización espacial celular y refleja, la ya comentada estrecha conexión entre el metabolismo primario y secundario.

Las fitohormonas afectan a las reacciones del metabolismo que llevan al crecimiento y a la diferenciación del organismo y como consecuencia también afectan al metabolismo secundario, y así, la biosíntesis y acumulación de la mayor parte de los productos secundarios suele estar restringida a estados particulares del desarrollo del organismo productor e integrada en un programa específico de diferenciación (Dougall,1980), por ello la diferenciación celular es uno de los hechos fundamentales para la regulación del metabolismo en todos los organismos vivos.

Las proteínas formadas como resultado de los múltiples procesos de diferenciación pueden ser clasificadas con respecto a su significación biológica y función dentro de la célula productora como proteínas del metabolismo primario o como proteínas de especialización. Según esta clasificación, el metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, transformación y degradación de compuestos endógenos mediante proteínas de especialización (Lückner,1984).

Como veremos en el apartado I.4.5. (Regulación de la biosíntesis de cardenólidos), la actividad enzimática no sólo está modulada por señales hormonales, sino también por el pH, homeostasis, equilibrio iónico, luz (intensidad y fotoperíodo), temperatura, humedad. Estos factores interactúan entre sí y también con el equilibrio hormonal y como

influyen en el desarrollo y en el metabolismo (Martín,1980).

Otras circunstancias que pueden afectar al metabolismo, son las infecciones a las que pueden estar sometidas las plantas, o los plaguicidas con los que suelen tratarse.

Por todas estas razones se ha pensado en producir los metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales (ver sección 1.4.6.2.), ya que esta alternativa resolvería muchos de estos problemas ambientales facilitando la obtención de estos productos en condiciones controladas y sin tener que esperar todo el ciclo ontogénico de la planta.

4. CARDENOLIDOS

4.1. ORIGEN DE LOS CARDENOLIDOS

Los cardenólidos se forman en varias familias de plantas superiores y algunos animales, pero no pueden ser detectados en cultivos microbianos (Luckner,1984).

En las plantas se encuentran distribuidos entre varias familias que en general no están relacionadas entre sí (Rückner,1988). Aunque los más utilizados para el tratamiento de las enfermedades cardíacas se han aislado del género *Digitalis*, perteneciente a la familia Escrofulariaceas, también podemos encontrar estos compuestos en las familias Apocinaceas, Asclepidaceas, Crucíferas, Papilionaceas, Brasicaceas, Euforbiaceas, Moraceas, Ranunculaceas, Liliaceas, Tiliaceas y Esterculiaceas (Tschesche,1964). Según Shing y Rastogi (1970) los cardenólidos se encuentran como heterósidos en unas doce familias de plantas. Dentro de la familia de las Escrofulariaceas los cardenólidos se hallan con seguridad sólo en las especies de *Digitalis* (Rücker,1988). En *Digitalis lanata*, por ejemplo, se han identificado alrededor de 70 cardenólidos distintos (Groeneveld y col,1992).

4.2. ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS CARDENOLIDOS

Los cardenólidos son esteroides con las características químicas siguientes (Figura I-6):

a) Contienen en la posición 17 β del anillo esteroídico un anillo lactónico insaturado

INTRODUCCION

de 5 miembros (butenólidos) y en la posición 14 β un grupo OH, que causa una conexión inusual *cis* entre los anillos C y D.

b) Unión de los aglicones a azúcares poco frecuentes (deoxi y metoxi azúcares) o a ácidos en el grupo hidroxilo de la posición 3 β .

La actividad biológica de estos compuestos viene dada por el aglicón, cuyos sustituyentes influyen decisivamente; los azúcares son inactivos por sí mismos pero modifican la solubilidad y la potencia farmacológica del glucósido resultante (Fullerton, 1977; Rücker, 1988). Así, el azúcar del 3 β -OH se metaboliza lentamente, actuando como grupo protector para evitar que el OH en 3 se epimerice a α y pierda su acción, por eso los glucósidos tienen una acción más duradera que las geninas (Singh y Rastogi, 1970).

Los monosacáridos que forman parte de los glucósidos cardiotónicos se unen en número de uno a más de cuatro dispuestos en cadena, así de un mismo aglicón pueden existir las series tetra, tri, di o monoheterósidos. Estos monosacáridos son principalmente la D-glucosa y la L-ramnosa u otros deoxi o dideoxiazúcares como la D-digitoxosa, D-cimaraosa y D-digitalosa. Los dideoxiazúcares se encuentran con frecuencia en los glucósidos cardiotónicos de las plantas superiores (Franz y Hassid, 1967) (Figura I-7).

En la digitoxina las tres moléculas de D-digitoxosa se encuentran en la conformación de silla, lo mismo que en los mono y bis digitoxósidos de la digitoxigenina. Esta es la misma conformación que se observa en la digitoxosa libre (Drakenberg, 1990) (Figura I-8).

4.3. FUNCIONES Y MECANISMO DE ACCION

Gran número de extractos vegetales que contienen glucósidos cardiotónicos han sido utilizados desde la antigüedad como venenos, este hecho se debe a la escasa diferencia que existe entre sus niveles farmacológicos y tóxicos (Robinson, 1980; Ritz y col, 1992; Schmidt, 1992; Kelly y Smith, 1992).

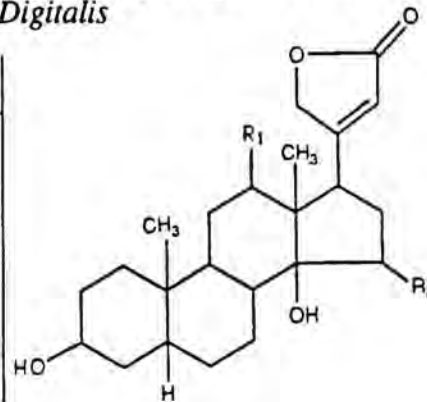
Su actividad sobre el corazón consiste en aumentar la contracción sistólica y la eficacia mecánica del músculo cardíaco, de modo que un corazón insuficiente puede realizar el mismo trabajo con un consumo menor de oxígeno (efecto inotrópico positivo), además, también mejoran el vaciado ventricular rebajando así la presión venosa (Bolognesi y col, 1992; Goldsmith y col, 1992; Smith y col, 1993). La digitoxina, principal cardenólido de la *Digitalis purpurea*, puede hidroxilarse en el organismo dando dihidrodigitoxina y también convertirse en digoxina por una hidroxilación en el hígado (Desta y col, 1982).

El mecanismo que se propone en la actualidad para explicar la acción de los

FIGURA I-6

Estructura química de los cardenólidos, y principales glucósidos de las especies de *Digitalis*

	R ₁	R ₂
DIGITOXIGENINA	H	H
GITOXIGENINA	H	OH
GITALOXIGENINA	H	OCHO
DIGOXIGENINA	OH	H
DIGINATIGENINA	OH	OH



AGLICONES

GLICOSIDOS

AZUCARES

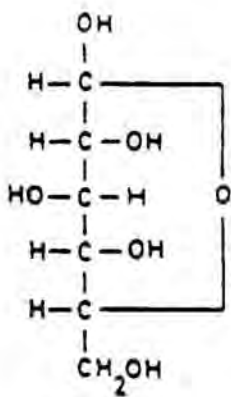
Digitoxigenina	Lanatóside A Glucodigifucósido Glucoevatomónosido Purpurea glicósido A Digitoxina	Gl-Acdx-Dx-Dx- Gl-Fc- Gl-Dx- Gl-Dx-Dx-Dx- Dx-Dx-Dx-
Gitoxigenina	Lanatóside B <i>Digitalinum verum</i> Glucogitorósido Purpurea glicósido B Gitoxina	Gl-Acdx-Dx-Dx- Gl-Dtl- Gl-Dx- Gl-Dx-Dx-Dx- Dx-Dx-Dx-
Digoxigenina	Lanatóside C Digoxina	Gl-Acdx-Dx-Dx- Dx-Dx-Dx-
Diginatigenina	Lanatóside D Diginatina	Gl-Acdx-Dx-Dx- Dx-Dx-Dx-
Gitaloxigenina	Lanatóside E Glucoverodoxina Glucolanadoxina Glucogitaloxina Gitaloxina	Gl-Acdx-Dx-Dx- Gl-Dtl- Gl-Dx- Gl-Dx-Dx-Dx- Dx-Dx-Dx-

Acdx = 3-acetil-β-D-digitoxosa; Dtl = β-D-digitalosa; Dx = β-D-digitoxosa;
Fuc = β-D-fucosa; Gl = β-D-glucosa.

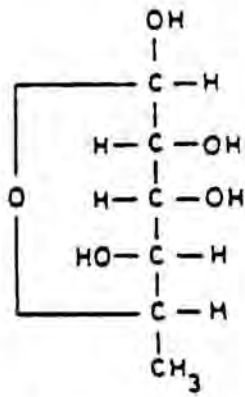
FIGURA I-7

Estructura de los principales azúcares constituyentes de los cardenólidos.

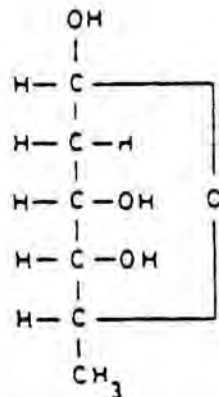
- D-glucosa
- D-digitoxosa.....2-desoxi-D-alo-metilosa
- D-digitalosa.....D-fucosa-eter metílico
- D-diginosa.....D-desoxi-D-fucosa-3-eter metílico
- D-cimarosa.....D-digitoxosa-3-eter metílico
- L-oleandrosa.....2-desoxi-L-ramnosa-3-eter metílico
- L-ramnosa
- D-fucosa



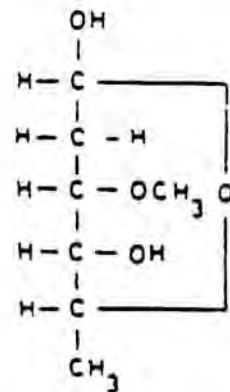
D-glucosa



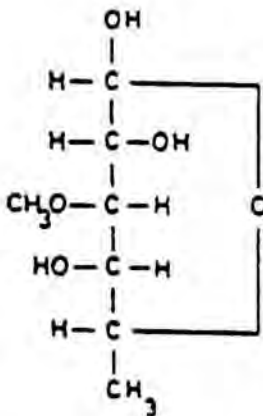
L-ramnosa



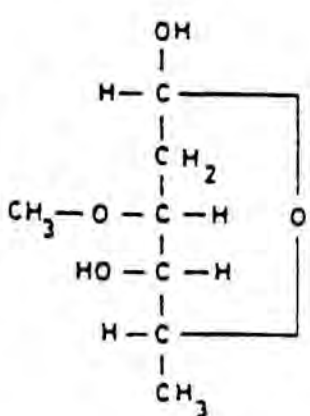
D-digitoxosa



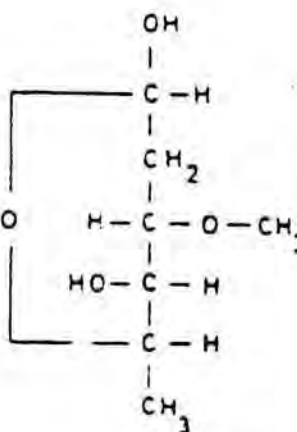
D-cimarosa



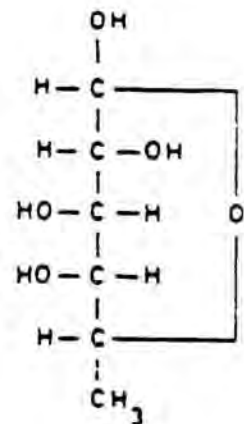
D-digitalosa



D-diginosa



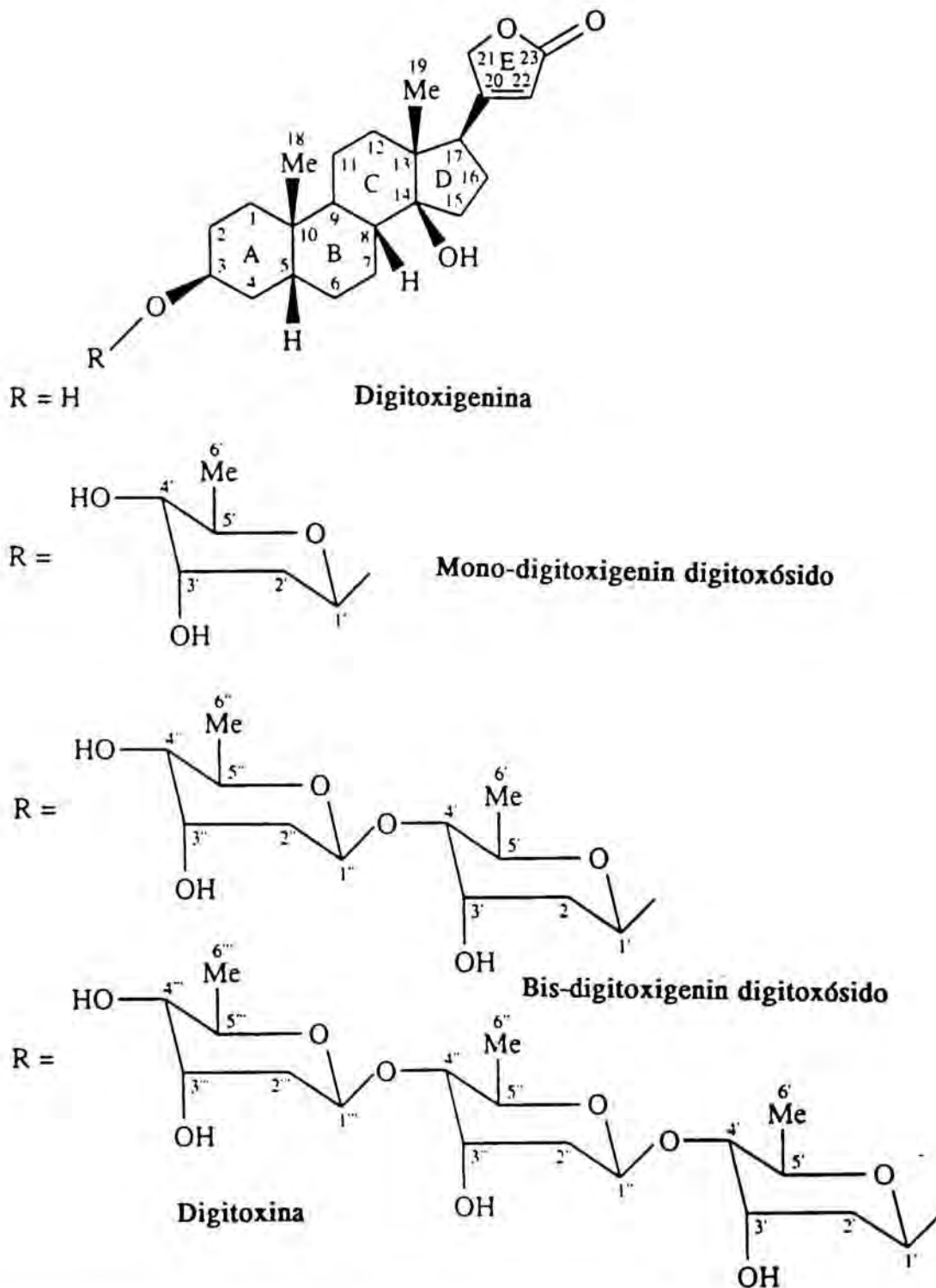
L-oleandrosa



D-fucosa

FIGURA I-8

Conformación en silla de las tres moléculas de D-digitoxosa de la digitoxina.



INTRODUCCION

cardenólidos se conoce como "hipótesis de la bomba retardada" (Lager, 1983), y se formula como sigue: Los glucósidos cardiotónicos se unen con absoluta especificidad y alta afinidad a receptores específicos localizados en la superficie externa del sarcolema como una parte de la subunidad de la Na^+/K^+ -ATPasa. La bomba Na^+/K^+ empieza a inhibirse parcialmente, no hay flujo de Na^+ hacia el exterior por lo cual el Na^+ intracelular queda retenido. Esto altera la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ocasionando un aumento transitorio en el Ca^{2+} intracelular por mayor flujo en la entrada de Ca^{2+} y/o inhibición de su salida. La disponibilidad elevada de Ca^{2+} aumenta la contractilidad del músculo cardíaco y de ahí el efecto inotrópico positivo.

Se sabe que dosis tóxicas de la droga también aumentan los niveles de Ca^{2+} intracelular contribuyendo a la arritmia, por eso se sugirió que el efecto tóxico de la *Digitalis* representaría una prolongación del mismo mecanismo responsable del efecto inotrópico positivo. Esto, sin embargo, queda por explicar. Investigaciones más recientes apuntan a que el mecanismo de acción puede ser más complejo y proponen más de uno para explicar la inotropía. Si esto fuera así nos inclinaríamos a especular que inotropía y toxicidad, en *Digitalis*, no necesariamente representan un único e igual mecanismo (Heller, 1990).

4.4. BIOSINTESIS DE CARDENOLIDOS

La formación de los glucósidos cardiotónicos no sigue un camino biosintético único, y constituye un ejemplo de "red metabólica" característica del metabolismo secundario; existen numerosos pasos alternativos que son activos en mayor o menor grado dependiendo del estado ontogénico de la planta, las condiciones externas y la especie vegetal estudiada; la existencia de vías opcionales podría atribuirse a la falta de especificidad que presentan numerosos enzimas implicados en el proceso (Benveniste, 1986).

En la planta de *Digitalis* la biosíntesis de glucósidos cardiotónicos se realiza en el mesófilo de la hoja, y los compuestos formados se acumulan en las vacuolas de las células de la hoja (Hagimori y col, 1984a; Luckner y Dietrich, 1988; Hoelz y col. 1992). Los cultivos *in vitro* vegetales no llegan a acumular grandes cantidades de estos compuestos, por lo que parece que su biosíntesis podría estar interrumpida en uno o varios pasos, por ello es necesario un estudio detallado del proceso biosintético, para establecer que pasos presumiblemente podrían encontrarse bloqueados.

Según Groeneveld (1991) en la biosíntesis de los 5 β cardenólidos se pueden considerar tres grandes etapas:

- 1) **Formación del núcleo esteroídico a partir del ácido mevalónico.**
- 2) **Construcción del anillo butenólido por condensación de un derivado del**

pregnano con una molécula de acetato.

3) Glucosidación con una cadena no ramificada de más de cuatro (deoxi) azúcares en el C-3.

En la Figura 1-9 se muestran los principales pasos de la biosíntesis de cardenólidos.

4.4.1. FORMACION DEL NUCLEO ESTEROIDICO A PARTIR DEL ACIDO MEVALONICO.

La formación del núcleo esteroídico de los cardenólidos se realiza por la ruta del acetato-mevalonato, es un proceso complejo que se podría dividir en 5 pasos diferenciados:

a) Ruta del acetato-mevalonato : Obtención del escualeno.

Es el camino común para la biosíntesis de todas las estructuras esteroídicas tanto en animales como en plantas (Bennet y Heftmann, 1965a). En 1960 se demostró que las plantas de *Digitalis* utilizan acetato marcado para la síntesis de cardenólidos. Experimentos posteriores realizados por Euw y Reichstein (1964) y Tschesche, (1972) con ácido mevalónico marcado dieron resultados parecidos. Gros y Leete (1965) trabajando con plántulas de *Digitalis purpurea* confirmaron que los esteroides tanto de animales como de plantas se producen, vía escualeno, por la misma ruta biosintética. Se ha podido establecer que todos los átomos de carbono de los esteroides vegetales, excepto los C22 y C23, derivan del ácido mevalónico (Goad, 1967; Goad y Goodwin, 1972). Se cree que el camino biosintético desde el acetato hasta la formación del 2,3-óxido de escualeno es común en animales, plantas vasculares y hongos (Benveniste, 1986).

En estudios recientes realizados por Groeneveld y col. (1992) se observó que administrando acetato, malonato, mevalonato, glucosa y sacarosa marcados a hojas jóvenes de *Digitalis lanata* el malonato era el que más se incorporaba a los cardenólidos.

El malonato, pues, parece ser el mejor precursor entre los citados para la biosíntesis de los 5 β cardenólidos en *Digitalis lanata*, al igual que ocurre en el caso de la biosíntesis de los 5 α cardenólidos en *Asclepias curassavica* (Groeneveld, 1990). Sin embargo, no hay datos suficientes todavía para pensar en un camino de síntesis a partir de malonato, con una posible intervención del metabolismo de los lípidos. La contribución de malonato a la biosíntesis de cardenólidos podría interpretarse diciendo que este precursor puede ser descarboxilado y entrar en la síntesis de terpenoides como acetato; se requieren no obstante ulteriores estudios.

Siguiendo con la ruta del acetato-mevalonato, a partir de acetil CoA y acetacetil CoA se forma 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA que por la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa se transforma en mevalonato en el citoplasma, esta reacción es irreversible. El mevalonato, un compuesto de 6 átomos de carbono, es el primer precursor específico de los terpenoides (Goodwin, 1974).

INTRODUCCION

Por medio de tres fosforilaciones consecutivas, el mevalonato se convierte en 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato, intermediario lábil que pierde CO_2 y Pi dando 3-isopentenilpirofosfato; éste se isomeriza formando dimetilalilpirofosfato y ambos se unen dando geranylpirofosfato que por adición de una segunda molécula de isopentenilpirofosfato dará farnesilpirofosfato (compuesto de 15 átomos de carbono). Finalmente dos moléculas de farnesilpirofosfato, por una condensación reductora catalizada por el enzima escualeno sintasa, originan preescualenopirofosfato que se convierte en escualeno en presencia de NADPH. En ausencia de NADPH el preescualenopirofosfato se acumula en lugar del escualeno (Heintz y col,1972). El escualeno es precursor de todos los triterpenos, entre los que se incluyen los esteroides (Grunwald,1975).

b) Ciclación del escualeno a cicloartenol:

A partir del escualeno se forma el 2,3-óxido de escualeno y aquí surge una dicotomía entre los organismos eucariotas no fotosintéticos donde este compuesto se cicla para formar lanosterol, y los organismos fotosintéticos que forman cicloartenol (Ness,1977; Goodwin, 1979), el precursor de todos los esteroides vegetales. El cicloartenol, junto al 24-metilencicloartenol, es un producto ampliamente distribuido en el reino vegetal (Benveniste y col,1966). También se han encontrado en todas las plantas los siguientes compuestos denominados fitoesteroides: 4-desmetilesterol, campesterol, colesterol, estigmasterol y β -sitosterol (Bennet y Heftmann,1965a; Helmbold y col,1978).

Según Benveniste (1986), la oxidación y la ciclación del escualeno son dos hechos que tienen lugar por separado. Por acción de una monooxigenasa estereoespecífica dependiente de O_2 y NADPH y que se encuentra en la fracción microsomal se forma un intermediario reactivo, el epóxido de escualeno (Reid,1968). El grupo OH deriva del oxígeno molecular. Sobre este compuesto actuaría otro enzima microsomal, la 2(3)-oxidoescualeno ciclasa que cataliza la ciclación de la forma en *trans*. La ciclación se inicia por ataque de un protón sobre la función epóxido que conduce a la apertura del anillo, como consecuencia aparece una carga positiva sobre el C-2. A continuación se produciría una reordenación molecular mediante una serie de transposiciones de átomos de hidrógeno y la emigración de dos grupos metilo, que conduciría a la formación de un compuesto de transición con un carbocatión en posición 9 (Ness,1977; Goodwin,1979). No se sabe como el enzima estabiliza este carbocatión, pero se piensa que es importante para el final del proceso.

c) Biosíntesis de colesterol:

El cicloartenol puede utilizarse para la biosíntesis de fitoesteroides y para la biosíntesis de colesterol, este último camino es minoritario y es el que se sigue para la biosíntesis de cardenólidos (Grunwald,1980; Nahrstedt,1982).

El colesterol parece ser un intermediario clave en la biosíntesis de esteroides tanto en animales como en plantas. En los vegetales comprende alrededor del 3% del peso total de los esteroides, y sin embargo estudios con mevalonato marcado demuestran que se incorpora más al colesterol que a otros esteroides. Esto significaría que se trata de un compuesto altamente inconvertible (Jacobsohn y Frey, 1967). Las plantas, a diferencia de los animales, tienen gran capacidad de introducir modificaciones en la molécula de colesterol haciéndolo más hidrosoluble, así, pueden alterar la cadena lateral insaturándola en C22 (una reacción imposible en los animales) y también pueden realizar la conjugación en C3.

La biosíntesis de colesterol en las plantas no se ha estudiado en profundidad, pero se sabe que no requiere la alquilación del C24, por ello, el primer paso podría ser la desmetilación en C4 α del cicloartenol que originaría 31-norcicloartenol. Durante el proceso de desmetilación, el grupo metilo de la posición 4 β se epimeriza a 4 α y el hidrógeno en 3 α se pierde (Knapp y Nicholas, 1970) mediante un proceso que posiblemente implica una 3-cetona como intermediario (Rees y col, 1968; Swindell y Gaylor, 1968). Knapp y Nicholas (1971) propusieron un mecanismo alternativo en el que se da una oxidación secuencial que pasa por un alcohol primario en 4 α hasta la formación de un ácido carboxílico. Durante la descarboxilación se elimina un ión hidruro del C3, obteniéndose un intermediario con un doble enlace entre las posiciones 3 y 4 que es un enol tautómero de la cetona antes mencionada. Posteriormente se produce la apertura del 9 β -19 β -ciclopropano para dar 31-norlanosterol (Heintz y Benveniste, 1974).

El anillo de ciclopropano no permite que se produzca la desmetilación en la posición 14, pero una vez obtenido el 31-norlanosterol ya es factible que este proceso se realice. Después de una reordenación de dobles enlaces en el anillo B, se obtiene el 24,25-dehidrolofenol como intermediario. En este punto se produce una bifurcación en el camino biosintético que conduce a la formación de colesterol por una parte y a la de fitoesteroides por otra.

La secuencia de reacciones para la formación del colesterol no está establecida por completo pero se sabe que se produce otra desmetilación del C4, la reducción del doble enlace de las posiciones 24 y 25, y la reordenación de dobles enlaces en el anillo B. Devys y Barbier (1967) creen que esta segunda desmetilación del C4 podría tener lugar antes de la apertura del anillo de ciclopropano. En estos procesos se han aislado como intermediarios 24,25-dehidrolofenol, desmosterol y lofenol (Gibbons y col, 1967). Hay también datos de interconversión de colesterol en campesterol y estigmasterol (Tso y Cheng, 1971).

d) Transformación del colesterol en progesterona :

Caspi y col. (1966) encontraron que todas las plantas de *Digitalis purpurea* pueden degradar el colesterol a pregnenolona. Tschesche y Lillianweiss en 1964 y 1965, y después Sauer y col. en 1967 demostraron que la pregnenolona es el precursor biogénico de los cardenólidos, administrando un glucósido de pregnenolona marcado a hojas de *Digitalis*

INTRODUCCION

lanata se obtenían cardenólidos marcados. Para llegar a pregnenolona es necesaria la escisión de la cadena lateral del colesterol, esta escisión se produciría con dos hidroxilaciones sucesivas del colesterol (Burstein y col,1975) catalizadas por monooxigenasas dependientes del citocromo P450 que se hallan en la mitocondria (muchos autores denominan a este citocromo P450 scc "del inglés Side Chain Cleavage") y requieren la presencia de adrenoxina, adrenoxin reductasa y un sistema generador de NADPH (Morisaki y col,1985). Se cree que los intermediarios podrían ser el 22- β -hidroxicolesterol y 20- α -22R dihidroxicolesterol. Este último sería escindido por la 20- α -22R dihidroxicolesterolaldolasa dando como productos aldehído isocaproico y pregnenolona. Para la conversión de un mol de colesterol en pregnenolona y aldehído isocaproico son necesarios tres moles de oxígeno molecular y tres de NADPH. La presencia de un enzima encargado de la rotura de la cadena lateral del colesterol se ha demostrado en plántulas de *Digitalis purpurea* pero no en cultivos de tejidos de esta planta (Pilgrim,1972).

Sobre la pregnenolona actuarían consecutivamente la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la esteroide isomerasa para originar directamente progesterona.

Caspi y Lewis (1967) sugirieron que la progesterona, una 3-cetona con un doble enlace entre C4-C5, podría ser la intermediaria en la conversión del doble enlace en posición C5-C6 de la pregnenolona a la configuración 5 β saturada de los cardenólidos. Resultados obtenidos posteriormente por Horst y col.(1967) al detectar 5 β -pregnandiona como metabolito de la pregnenolona apoyan esta teoría, aunque no quedaba claro que este compuesto fuera necesariamente un intermediario del camino mayoritario que transforma la pregnenolona en cardenólidos. Sí parece que la formación de progesterona u otro intermediario 3ceto- Δ^4 insaturado es obligada para que la hidrogenación del doble enlace dé compuestos A/B *cis* como los cardenólidos (Tschesche,1972).

Caspi y Hornby (1968) administrando 3 α -³H-pregnenolona y 4-¹⁴C-pregnenolona a plantas de *Digitalis lanata* observaron que la oxidación del C3 es un paso obligado en este camino biosintético ya que aislaron digitoxigenina marcada con ¹⁴C, pero con ausencia total de tritio.

e) Ruta de los pregnanos :

Las reacciones que van desde la formación de pregnenolona hasta los cardenólidos se han denominado genéricamente "ruta de los pregnanos". La pregnenolona ocupa el mismo lugar clave para la formación de esteroides C₂₁, C₂₂ y C₂₃ en animales y en plantas (Schütte 1975). Según Tschesche (1971), la biosíntesis de cardenólidos se produce por condensación de una unidad de 21 átomos de carbono derivada de la progesterona (o este mismo compuesto) con una molécula de acetato. La secuencia de reacciones sería la siguiente (Caspi y Lewis,1967; Sauer y col,1967; Bennet y col,1968; Tschesche y col,1970) :

INTRODUCCION

progesterona ---- > 5 β -pregnano-3,20-diona ---- > 5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona ---- > 5 β -pregnano-3,14-diol-20-ona ---- > 5 β -pregnan-3,14,21-triol-20-ona ---- > digitoxigenina.

Primero se introducen dos funciones oxigenadas en los carbonos 14 y 21 del 5 β -pregnano-3-ol-20-ona según Caspi y col.(1968), estudios realizados por este mismo autor parecen demostrar que se producen otras transformaciones antes de la hidroxilación en el carbono 21. En la biosíntesis de gitoxigenina en *Digitalis purpurea* tiene lugar un reemplazamiento directo del protón 16 β de la pregnenolona por un grupo OH (Varma y Caspi,1970). La reducción del doble enlace en 4 de la progesterona da lugar a una mezcla de isómeros 5 α y 5 β -H-pregnano-3,20-diona (Graves y Smith, 1967). Se ha aislado y caracterizado a partir de cultivos de células de *Digitalis lanata* la progesterona 5 α reductasa, el enzima que cataliza la reducción de progesterona a 5 α -pregnano-3,20-diona y posteriormente a 5 α -pregnano-3 β -ol -20ona. No está claro todavía que las dos reducciones sucesivas estén catalizadas por este mismo enzima (Wendroth y Seitz,1990). La progesterona 5 α reductasa parece estar localizada en la fracción microsomal, y se encuentra tanto unida a la membrana del retículo endoplasmático como en la fracción soluble. Se observa en *Digitalis* que el 5 α -H-pregnano-3,20-diona presenta nueve veces más radioactividad que el 5 β (Bennet y col,1968), lo mismo ocurre con el siguiente compuesto (Bennet y col,1968; Stohs y El-Olemy,1972b). Como la mayoría de cardenólidos del genero *Digitalis* son derivados 5 β -H se piensa que estaría implicada una isomerasa que convertiría los 5 α derivados a 5 β derivados a través de una reacción microsomal (Stohs, 1969). Además, suministrando 5 β -pregnano-3,20-diona y 5 β -pregnano-3 β -ol-20-ona se convertían con rapidez en digitoxigenina, digoxigenina y gitoxigenina (Tschesche y col,1970). Sin embargo, en cultivos de callo y de células en suspensión de *Digitalis purpurea* sólo se encuentran 5 α -compuestos a partir de progesterona o pregnenolona, y hay, por tanto, ausencia de cardenólidos (Graves y Smith,1967); esto sugiere que la reducción estereoespecífica de $\Delta^4 \alpha$ A/B cis debe estar bajo un control enzimático estricto (Furuya y col,1973). También Furuya y col. (1973) observaron que cultivos de células en suspensión de *Digitalis purpurea* podían convertir digitoxina en purpúrea glucósidos A y B y en gitoxina, como la planta intacta, pero no formaban cardenólidos a partir de progesterona.

La introducción del OH en posición 14 precede a la formación del anillo butenólido (Caspi y Lewis,1968) y posiblemente el intermediario formado sea el pregnano-3 β ,14 β -diol-20-ona (Tschesche y col,1970); la hidroxilación en 14 β de los cardenólidos sintetizados a partir de colesterol y sus derivados tiene lugar con inversión de la configuración en el carbono 14. Esta hidroxilación origina un 14 β compuesto a partir de un 14 α -H precursor; la participación de intermedios con un OH, epóxido o doble enlace centrado alrededor del C-15 o la implicación de Δ^7, Δ^8 o $\Delta^{8(14)}$ ha sido excluida como supuesto mecanismo de la 14 β -hidroxilación (Aberhart y Lloyd-Jones,1973) pero permanece la posibilidad de que ocurra una inversión en C14 seguida por una hidroxilación "normal" con retención de la configuración (Anastasia y Ronchetti,1977). A continuación se produciría la hidroxilación en posición 21.

4.4.2. CONTRUCCION DEL ANILLO BUTENOLIDO POR CONDENSACION DE UN DERIVADO DEL PREGNANO CON UNA MOLECULA DE ACETATO.

El 5 β -pregnano-3,14,21-triol-20-ona formado se condensaría con una molécula de acetato para formar el anillo butenólido, obteniéndose así digitoxigenina (Leete y col,1965; Tschesche,1972).

La formación del anillo lactónico es uno de los pasos finales en este camino biosintético, pues administrando posibles precursores con anillo ya formado no se incorporaban a los cardenólidos aislados posteriormente (Tschesche y col,1970).

Hasta hace poco la "ruta de los pregnanos" es la que se aceptaba comunmente como camino biosintético; en 1986 Maier y col. publicaron unos resultados que parecían demostrar la existencia de una ruta alternativa denominada "ruta de los ácidos norcolanólicos", donde la condensación del ácido acético se produce con un derivado 20-ceto del pregnano parcialmente hidroxilado como pregnenolona, progesterona, 3 β -hidroxi-5 β -pregnano-20-ona, etc. Administrando diferentes ácidos hidroxinorcolanólicos marcados, como el ácido 3 β -OH-23-norcola-5,20(22)E-dienólico, a plantas de *Digitalis purpurea* se producían digitoxina y gitoxina marcadas, lo que indica la existencia de una vía alternativa para la biosíntesis del anillo butenólido en los cardenólidos.

Sin embargo esto parecía contradecir las observaciones de Tschesche y col. (1970) según las cuales previamente a la introducción del acetato es necesario que se produzcan todas las modificaciones estereoquímicas y la introducción de grupos funcionales en el sistema esteroídico tetracíclico del pregnano, tal como ocurre en la "ruta de los pregnanos".

Resultados posteriores obtenidos por Deluca y col. (1989) parecen confirmar que el ácido 23-norcolanólico es un intermediario biosintético real entre el 20-cetopregnano y los cardenólidos en plantas de *Digitalis purpurea*. Sus resultados llevan a proponer que el camino biosintético podría involucrar, después de la condensación de una unidad acetato, una deshidratación de un intermediario 20-OH para dar una $\Delta^{20(22)}$ -cadena lateral insaturada, la cual después de una hidroxilación alílica en C-21 daría el anillo lactónico insaturado. También demostraron que varios derivados del ácido 23-norcolanólico pueden actuar como precursores del anillo butenólido de los cardenólidos en plantas de *Digitalis purpurea*.

Estos resultados indican que la condensación de la unidad acetato con un 20-ceto pregnano para dar el anillo lactónico puede ser anterior a la hidroxilación del C-21 y C-14 β del intermediario pregnano, lo cual es apoyado por el trabajo de Caspi y col. (1968) que encontraron que la hidroxilación en C-21 de un 20-cetopregnano como la progesterona no tenía una significación mayor en la biosíntesis de cardenólidos. Todo esto confirma que el ácido 23-norcolanólico es el intermediario sintético real entre el 20-cetopregnano y los cardenólidos en *Digitalis purpurea*.

Así pues, se admite la existencia de dos vías alternativas para la formación del anillo butenólido en la biosíntesis de cardenólidos.

4.4.3. GLUCOSIDACION CON UNA CADENA NO RAMIFICADA DE MAS DE CUATRO (DEOXI) AZUCARES EN EL C-3.

Las mitades azúcar de los cardenólidos son normalmente glucosa o aldohexosas no ramificadas mayormente de los tipos 6-deoxi, 2-deoxi y 2,6-dideoxi (Franz y Hassid,1967), aunque también se han encontrado algunos derivados de azúcares nuevos.

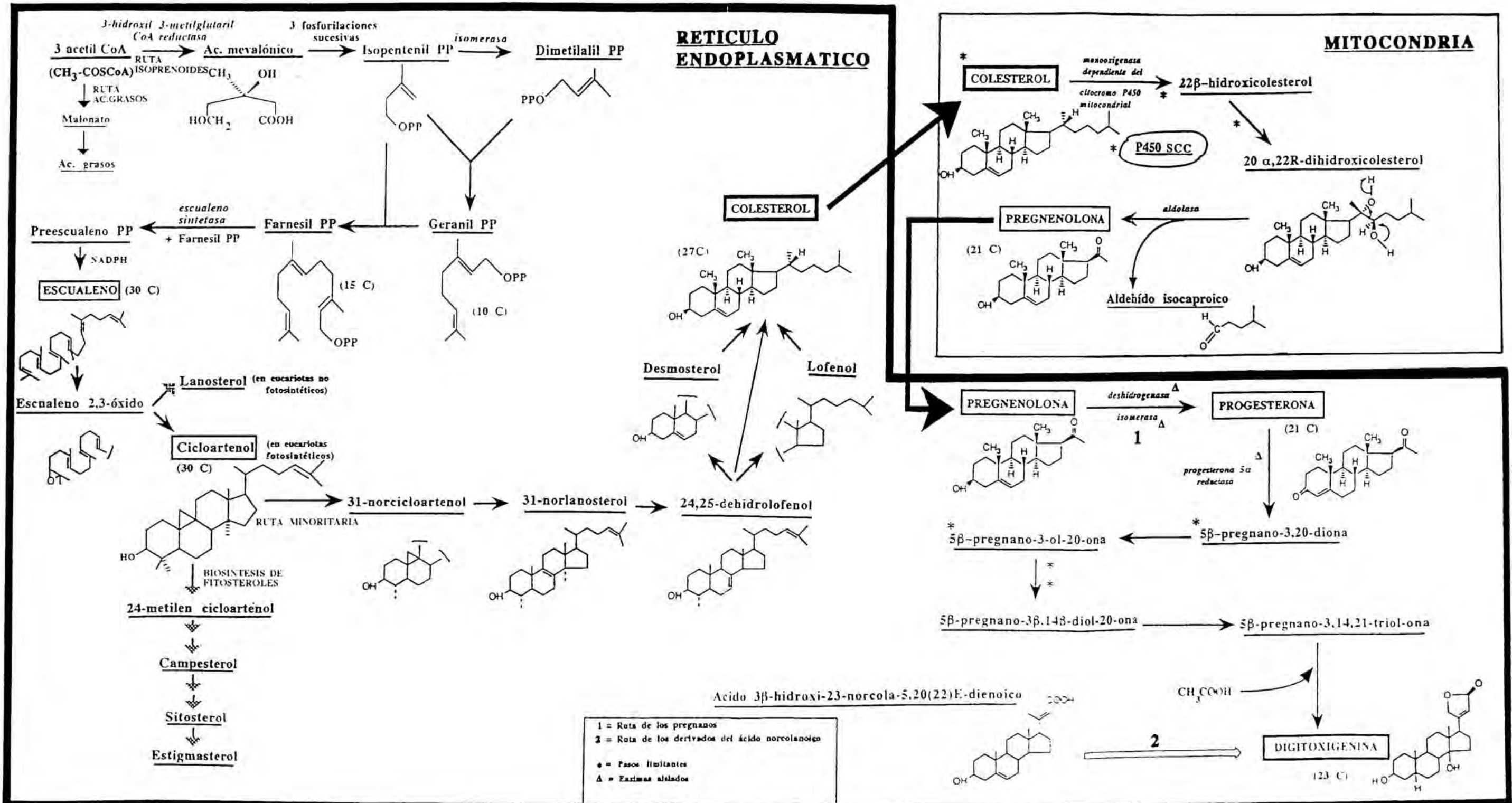
Se ha demostrado, administrando diversos azúcares marcados, que la D-glucosa es el precursor más efectivo de la Digitoxosa, uno de los dideoxiazúcares mayoritarios en *Digitalis purpurea* (Euw y Reichstein,1966; Franz y Hassid,1967).

Por encima de cinco azúcares pueden formar una cadena lineal que se une siempre en β con el C-3 del aglicón y constituye el glucósido (Grunwald,1980).

De todo lo expuesto podemos resumir los puntos que dificultan la producción de cardenólidos en condiciones no usuales para la planta:

- 1) Los bajos niveles de colesterol.
- 2) La isomerización de la posición 5α a la 5β (que es la configuración propia de los cardenólidos en *Digitalis*).
- 3) La hidroxilación en posición 14β , que debe ocurrir con inversión de la configuración.
- 4) La escisión de la cadena lateral del colesterol.

FIGURA I-9: Esquema de la biosíntesis de cardenólidos.



4.5. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE CARDENOLIDOS

La biosíntesis de cardenólidos, así como la de los productos secundarios en general, está condicionada por una serie de factores externos a la planta (luz, nutrientes, etc.) y por los llamados factores biológicos, inherentes a la misma, como son los factores genéticos, morfológicos y bioquímicos.

La planta intacta posee la plena capacidad para la biosíntesis de cardenólidos, pero como todas las síntesis complejas está condicionada no solo por los factores naturales que ya hemos comentado, sino también por cualquier estrés ya sea físico, químico o biológico al que las plantas, en condiciones de campo, puedan estar sometidas. Esto hace que el estudio de la regulación de la biosíntesis de los cardenólidos sea difícil en la planta completa.

Por ello, se ha pensado en estudiar esta síntesis en cultivos de tejidos, ya que estos representan una simplificación, además de no tener los riesgos de los factores climáticos ni las agresiones biológicas. Sin embargo, en este caso, han surgido dificultades, ya que parece existir una represión que impide o al menos limita la formación de cardenólidos, y como consecuencia puede darse la acumulación de productos intermediarios e incluso la síntesis de sustancias que no se encuentran en el vegetal. La acumulación de intermediarios nos puede indicar los puntos en los que quedan inhibidos los pasos biosintéticos en el cultivo *in vitro* y este conocimiento nos permite modificar los factores físicos o químicos del cultivo para que incidiendo sobre el potencial genético se elimine la represión.

4.5.1. FACTORES EXTERNOS

Variaciones en las condiciones ambientales no solo inducen cambios en el metabolismo primario, sino que también llevan a alteraciones en el metabolismo secundario. La competitividad de las plantas en un ecosistema puede estar marcada por estos metabolitos secundarios.

LUZ

La luz es uno de los factores externos que más influyen sobre la biosíntesis de cardenólidos. Como vimos en el apartado I.2.3. la mayor riqueza en principios activos en la planta se alcanza durante las horas de sol. Por ello en el estudio de la biosíntesis de cardenólidos en cultivos *in vitro* se han realizado numerosos ensayos para determinar la clase y cantidad de luz más adecuada para la producción de estas sustancias.

Nover y col.(1980) estudiaron la influencia de la luz sobre la formación de cardenólidos en callos y cultivos de células en suspensión de varias especies de *Digitalis*, y observaron que aumentaba la formación de cardenólidos en ambos tipos de cultivo. Lo mismo comprobaron Garve y col.(1980) en cultivos celulares de *Digitalis lanata*.

INTRODUCCION

En 1982 Hagimori y col. estudiaron la producción de cardenólidos en células indiferenciadas y células formadoras de yemas de *Digitalis purpurea* cultivadas en medio líquido en condiciones de luz blanca y oscuridad. En los dos tipos celulares la luz favorecía la síntesis de cardenólidos, aunque existe síntesis en la oscuridad pero en menor grado.

En 1983 Olhsson y col. demostraron en células de *Digitalis lanata* que diferentes cantidades y clases de luz podían activar de forma distinta la biosíntesis de digitoxina y clorofila, por el contrario el contenido en digoxina permanecía invariable dentro de las distintas condiciones de luz examinadas. La luz blanca y la verde aumentaban el crecimiento pero esta última disminuía el contenido en cardenólidos, mientras que la luz azul provocaba un incremento en dicho contenido. Por el contrario, la luz amarilla y la oscuridad disminuían el crecimiento y la producción de cardenólidos.

Kuberski y col.(1984) encontraron que la acumulación de cardenólidos en cultivos de células en suspensión de *Digitalis lanata*, era mayor cuanto más largo era el período de iluminación con luz blanca de los embriones. Sin embargo, en células indiferenciadas la luz no aumentaba la síntesis de cardenólidos aunque éstas poseían más cardenólidos que las células indiferenciadas sin luz.

Algunos de estos hechos fueron confirmados por los estudios de Scheibner y col. (1987) con embrioides de *Digitalis lanata*; observaron que según el tipo de luz aplicada variaba la cantidad de cardenólidos. La luz azul y la roja cercana producían una acumulación mayor de estas sustancias que la luz roja lejana. Ya en 1978 Jacobson y col. encontraron que plántulas de *Digitalis* expuestas a la luz roja durante un corto período de tiempo aumentaban la acumulación de esteroides, este hecho implicaría la acción del fitocromo como activador de la síntesis de esteroides (Chasan,1991; Yamamura y col,1991).

Yoshimatsu y col. (1990) comprobaron otra acción positiva de la luz sobre la biosíntesis de cardenólidos. Dichos autores pudieron demostrar que las raíces transformadas de *Digitalis lanata* cuando crecían en la oscuridad, presentaban niveles muy bajos de cardenólidos, pero cuando se llevaban a la luz incrementaban enormemente dichos niveles.

También apoya estos resultados el trabajo de Solsona (1992) utilizando cultivos de callo de *Digitalis purpurea* crecidos en luz blanca, luz azul y oscuridad, observó un efecto estimulante de la luz sobre la síntesis de cardenólidos.

A pesar de que la luz ejerza una acción positiva sobre la biosíntesis de cardenólidos (Garve y col,1980; Luckner y Dietrich,1985) no podemos decir que sea un factor imprescindible, pues podría ser sustituida por otros factores y aún producirse mayor síntesis de cardenólidos en la oscuridad (Hagimori y col,1982a; Olhsson y col, 1983).

INTRODUCCION

TEMPERATURA

Existe aún poca información sobre cual es la temperatura óptima para los cultivos de tejidos y todavía hay menos datos sobre su influencia en la formación de metabolitos secundarios. De ahí que los cultivos se hagan rutinariamente a 25°C (Martín,1980).

Entre los pocos datos que hay sobre el efecto de la temperatura podemos citar los obtenidos por Weeks en 1970 que encontró que plántulas de tabaco crecidas a 27°C aumentaban un 100% su nivel de nicotina con respecto a las crecidas a 21°C. Trabajando con *Pelargonium*, se observó que el máximo crecimiento se da a 30°C, pero la máxima acumulación de alcaloides a 25°C y después decrece rápidamente, probablemente por el efecto de la temperatura sobre los enzimas.

NUTRIENTES

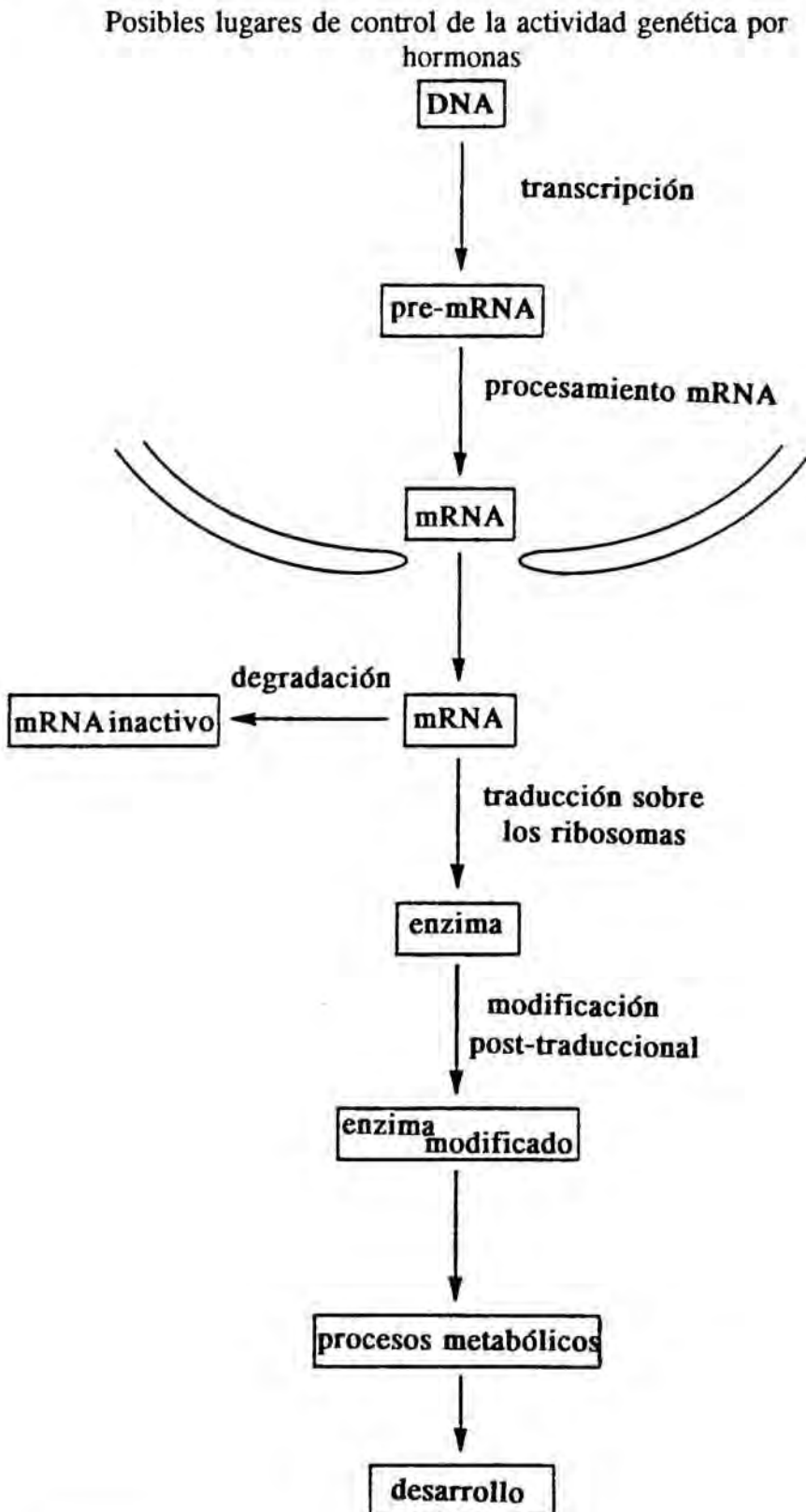
La composición química de los medios de cultivo óptimos para el crecimiento celular ha sido muy estudiada, sin embargo hay pocos trabajos sobre el efecto de los distintos nutrientes en la bioproducción de metabolitos secundarios.

Los macronutrientes inorgánicos que necesitan los cultivos *in vitro* son los mismos que los que requiere la planta intacta: N, K, P, Ca, S y Mg. Uno de los bioelementos más importantes es el N inorgánico que se aplica en concentraciones de 25 a 60mM, además, la presencia de sales amónicas favorece el desarrollo de las células. Entre los nutrientes esenciales que es necesario administrar en concentraciones micromolares están el Fe, Mn, Zn, B, Cu y Mo (el Fe y a veces el Zn se suministran en forma de quelatos). En algunos cultivos también es conveniente administrar Co al medio de cultivo.

Actualmente el medio más utilizado es el de Murashige y Skoog (1962), considerado idóneo para la mayoría de tejidos vegetales; no obstante algunos autores han conseguido mejorar la producción de metabolitos secundarios alterando las concentraciones de nutrientes de este medio básico.

Así, Hagimori y col. (1982b) lograron mejorar el contenido en cardenólidos en cultivos de tejidos de *Digitalis purpurea* modificando el medio de Murashige y Skoog; triplicaron la cantidad de fosfato y disminuyeron la de calcio y nitrógeno pero mantuvieron la proporción de NO₃/NH₄ (2:1), además añadieron tiamina y mio-inositol y llegaron a la conclusión de que estas dos sustancias eran imprescindibles para la síntesis de cardenólidos. Como fuente de carbono utilizaron sacarosa, glucosa o rafinosa al 3%. Existen también estudios realizados con cultivos de *Digitalis lanata* donde se mejora la producción de cardenólidos cambiando la proporción de NO₃/NH₄ (10:1) y utilizando maltosa como fuente de carbono (Kuberski y col,1984). También en cultivos celulares de *Digitalis thapsi* se ha podido comprobar que la concentración de fosfatos en el medio de cultivo influye sobre la producción de cardenólidos (Corchete y col,1991).

FIGURA I-10



INTRODUCCION

Las fuentes de carbono más habituales son la sacarosa y la glucosa aunque se han estudiado otras fuentes como la rafinosa, maltosa, lactosa, galactosa y almidón. Hay numerosos trabajos basados en la acción de los nutrientes minerales y las fuentes de carbono sobre la biosíntesis de cardenólidos (Garve y col,1980; Hagimori y col,1982a,1982b y 1983; Kuberski y col,1984).

Con respecto a las vitaminas las plantas normalmente sintetizan aquellas que necesitan para su crecimiento, pero en los cultivos *in vitro* estas sustancias podrían ser un factor limitante. Se conoce la absoluta necesidad de tiamina aunque se desconocen las bases bioquímicas de este requerimiento. En algunos casos, el crecimiento también mejora si se añade al medio de cultivo ácido nicotínico y piridoxina, y algunos cultivos pueden necesitar ácido pantoténico y biotina (Gamborg y Shyluk,1981).

EQUILIBRIO HORMONAL

Las hormonas vegetales ejercen su acción sobre el crecimiento, la diferenciación de los cultivos celulares y el metabolismo secundario. Por este motivo se han realizado numerosos estudios con fitohormonas para ver cómo influyen en la biosíntesis de los compuestos secundarios en cultivos *in vitro* e intentar incrementar la bioproducción.

Es sabido que las hormonas vegetales controlan la actividad genética; aunque todavía se desconocen los mecanismos bioquímicos que controlan los genes, se puede decir que su activación representa un complejo proceso de amplificación de la transcripción y traducción a enzimas con gran actividad catalítica, por lo cual se puede inducir la formación de grandes cantidades de un producto celular importante (Salisbury y Ross,1991).

Existen varios puntos de control en el flujo de la información genética desde el DNA hasta el producto molecular. Uno de ellos, quizás el más importante, se da a nivel de transcripción. Otro punto de control, también en el núcleo, se relaciona con el procesamiento del mRNA, porque la mayoría de moléculas de mRNA están parcialmente degradadas y algunas de sus partes se reordenan antes de que abandonen el núcleo (procesos postranscripcionales). Estos pasos del proceso están controlados por enzimas cuyas acciones deben ser reguladas, y las hormonas pueden actuar en esta regulación. Luego, el mRNA abandona el núcleo, probablemente a través de un poro nuclear, y en el citosol puede ya ser traducido sobre los ribosomas o degradado por las ribonucleasas. Si es traducido a un enzima, puede tener lugar una modificación post-transcripcional del enzima por procesos como una fosforilación, metilación, acetilación y glicosilación. Estos procesos, además, pueden estar afectados de nuevo por hormonas o por otros factores externos como la luz u otras señales del ambiente.

Los posibles lugares de control hormonal están señalados en la Figura I-10. En la Figura I-11 se observa un modelo de activación hormonal en la membrana plasmática.

Existen dos tipos de fitohormonas que presentan una especial importancia en los

INTRODUCCION

cultivos de tejidos vegetales, las citoquininas y las auxinas. En la proporción en que se encuentren, más que en las cantidades absolutas de cada una, está la clave para conseguir un grado de diferenciación morfológica (Skoog y Miller, 1957; Skvirsky y col, 1984) y bioquímica adecuadas que mejoren la producción de cardenólidos (Hagimori y col, 1982a).

Entre las fitohormonas naturales que se adicionan al medio de cultivo se encuentra la zeatina y el ácido 3-indolacético (AIA), pero en muchas ocasiones se aplican sustancias de síntesis con actividades análogas como la 6-furfurilaminopurina (kinetina), la benciladenina (BA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftalenacético (ANA).

La naturaleza y cantidad de las auxinas presentes en el medio de cultivo tiene un marcado efecto sobre el metabolismo primario y secundario (Everett y col, 1981), además, los procesos de diferenciación y morfogénesis pueden ser inducidos normalmente reduciendo la dosis de auxina o alterando el tipo de auxina presente en el medio.

La mayoría de autores utilizan como auxina el 2,4-D en concentraciones comprendidas entre 0,1 y 5 mg/l para obtener una mayor biomasa de callo en *Digitalis* (Perez Bermudez y col, 1983). Cuando se añade como citoquinina la kinetina (Ki) se utilizan concentraciones inferiores a 5mg/l, aunque si son superiores a 30mg/l pueden inducir organogénesis. Se sabe, que en explantes formados a partir de hojas adultas, las citoquininas estimulan la formación de yemas, las auxinas la diferenciación de raíces y las giberelinas promueven normalmente la formación de callos compactos (Rücker y col, 1976; Rücker, 1983). Sin embargo, los resultados más interesantes se encuentran al añadir giberelina al medio de cultivo, manteniendo las relaciones BA/AIA/Gb = 1/ 0,1/ 0,01, pues se estimula la formación de yemas en cultivos de callo de *Digitalis purpurea* (Rücker 1982a,b, 1988). En nuestro trabajo se han tenido en cuenta estas proporciones para lograr una mayor diferenciación en yemas, principalmente de parte aérea, de los callos objeto de estudio.

Como se ha indicado anteriormente, la acción de las fitohormonas sobre los cultivos *in vitro*, depende de la dosis aplicada y del tipo de tejido, pues cada material vegetal responde de forma distinta al estímulo de los reguladores del crecimiento.

La producción de cardenólidos en cultivos *in vitro* es un proceso complejo en el que las fitohormonas, entre otros factores, activan la diferenciación celular. Como hemos indicado anteriormente existe una conexión entre diferenciación y formación de cardenólidos en cultivos de callo y Hagimori y col. (1980) estudiando diversas especies de *Digitalis* observaron que esta conexión tiene especial importancia en *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*. Estos autores inducían la diferenciación utilizando dosis elevadas de citoquinina.

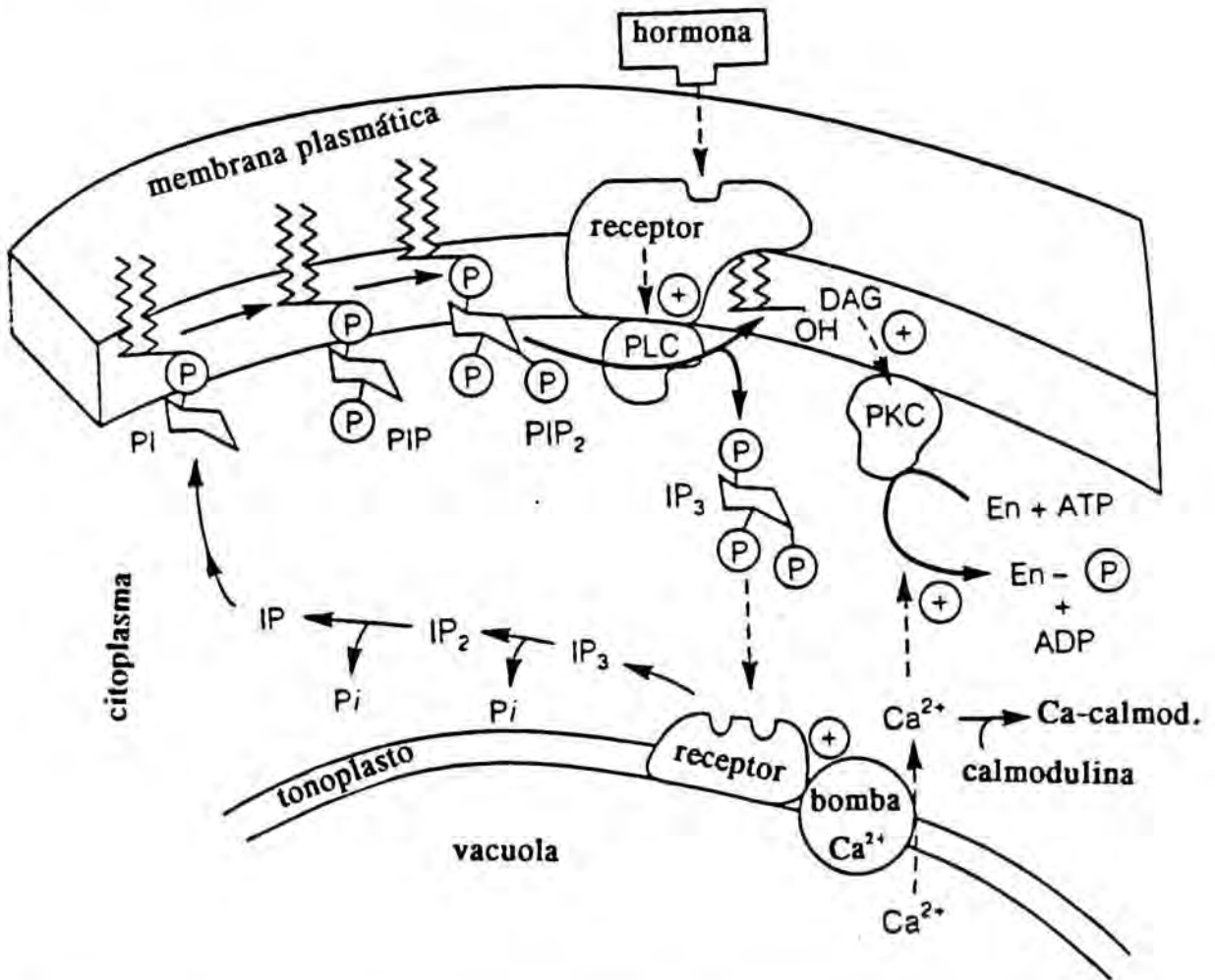
Garve y col. (1980) demostraron que el medio que contenía ANA/BA (0,1/2 mg/l) era más efectivo que el que contenía 2,4-D/Ki (1/0,02 mg/l) para la diferenciación celular y la formación de digitoxina en cultivos celulares de *Digitalis lanata*.

En 1981 Lui y Staba observaron que, en cultivos de *Digitalis lanata*, la giberelina

FIGURA I-11

Modelo del inicio de la transducción hormonal en la membrana plasmática.

La unión de una hormona a su receptor activa (+) la fosfolipasa c (PLC). Esta hidroliza un lípido de membrana, el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂), que produce inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y un diacil glicerol (DAG). El IP₃ se mueve hacia el tonoplasto en las células vegetales, donde se une a un receptor que activa (+) una bomba de Ca²⁺ o transportador que mueve al Ca²⁺ desde la vacuola al citoplasma. El DAG, que permanece unido a la membrana, activa la proteínaquinasa C (PKC); ésta a su vez, es activada por el Ca²⁺ procedente de la vacuola y fosforila a varios enzimas. El Ca²⁺, ya sea libre o unido a la calmodulina, también activa a otras proteína kinasas y a otros enzimas. El IP₃ pierde los fosfatos por hidrólisis dando IP₂ e IP, que se convierten después en fosfatidilinositol (PI) y otros fosfoinositoles (PIP y PIP²) de la membrana plasmática.



INTRODUCCION

estimulaba la producción de digoxina, mientras que la benciladenina la inhibía; además, demostraron que la producción de cardenólidos aumentaba con la edad del cultivo. Ohlsson y col.(1983) corroboraron estos resultados, al comprobar que el ácido giberélico incrementaba el contenido en cardenólidos totales en cultivos *in vitro* de *Digitalis lanata* crecidos en la oscuridad.

Para mejorar la producción de cardenólidos en cultivos celulares de *Digitalis purpurea* Hagimori y col.(1982a) establecieron unas concentraciones óptimas para cada hormona: BA: 0,01 a 1mg/l; AIA: 0,1 a 1mg/l; ANA: 0,1mg/l y 2,4-D:0,01mg/l.

Estudios realizados por Ohlsson y col.(1983) demostraron que la BA en una concentración de 0,2mg/l estimulaba la síntesis de cardenólidos en células de *Digitalis lanata* cultivadas *in vitro* y crecidas en la luz y en la oscuridad. Atribuyeron este efecto a que las hormonas favorecían la diferenciación de los tejidos.

Kuberski y col.(1984) indicaron que en *Digitalis lanata* la formación de cardenólidos y la embriogénesis en los callos aumentaba considerablemente al incrementar la relación citoquinina/auxina en el medio de cultivo, sin embargo concentraciones elevadas de auxina producían un efecto inhibitorio.

Por otra parte, estudios sobre el efecto del ácido abscísico (ABA), hormona inhibidora del crecimiento vegetal, y la giberelina en la producción de cardenólidos en cultivos celulares de *Digitalis lanata*, demostraron que el ABA inhibía la producción de cardenólidos en todas las cepas estudiadas, debido probablemente a su acción represora de la morfogénesis; y la giberelina disminuía el contenido en las cepas crecidas a la luz, en cambio producía un efecto estimulante en las cepas crecidas en la oscuridad (Ohlsson,1990).

En trabajos realizados en nuestro laboratorio con cultivos de callo de *Digitalis purpurea* (Solsona,1992; Morales y col,1992a) también se ha comprobado que una relación citoquinina/auxina baja disminuye la síntesis de cardenólidos, y que la giberelina no estimula la biosíntesis aunque sí retarda la degradación de los cardenólidos sintetizados.

OTROS FACTORES EXTERNOS

Existen otros factores externos que también influyen en la biosíntesis de cardenólidos. Se ha estudiado el efecto de la aireación en cultivos celulares en medio líquido utilizando fermentadores; intentando optimizar el contenido de digitoxina en cultivos de *Digitalis purpurea* se observó que la aireación apenas influía (Hagimori y col,1984b), mientras que en suspensiones celulares de *Digitalis lanata* el contenido en cardenólidos era muy superior si se utilizaban biorreactores con agitación mecánica, si bien en este caso la tasa de crecimiento era muy inferior y las células aparecían deterioradas (Markkanen y col,1984). Diettrich y col.(1985) almacenaron cultivos celulares de *Digitalis lanata* durante tres años congelados con nitrógeno líquido y observaron que no habían perdido la capacidad de producir cardenólidos.

INTRODUCCION

Stuhlfauth y col.(1987) estudiaron el efecto del CO₂ y el stress de agua (dentro de los límites fisiológicos) sobre el peso fresco, peso seco y contenido en cardenólidos en plantas de *Digitalis lanata*. Concluyeron que un enriquecimiento en CO₂ atmosférico favorecía la producción de biomasa, así como la síntesis de cardenólidos. En cuanto al stress de agua, además de disminuir el crecimiento, también disminuía la producción de cardenólidos.

Recientemente se han realizado estudios en nuestro laboratorio en plantas de *Digitalis purpurea* y *D. lanata* que indican que la salinidad no parece influir decisivamente en la biosíntesis de cardenólidos (Morales y col,1993; Morales y Chama,1993).

En cuanto al pH del medio, en general, el óptimo es 5,6-5,8 y en ocasiones para mantenerlo se utilizan soluciones amortiguadoras.

XENOBIOTICOS: FENOBARBITAL

Es bien conocido que el Fenobarbital y otras sustancias químicas inducen la expresión de enzimas metabolizadores de drogas y esteroides en tejidos del hígado. Estas respuestas inducidas pueden tener un mayor impacto sobre el metabolismo de drogas (farmacocinética e interacciones droga-droga), sobre la toxicidad y carcinogénesis de sustancias químicas y sobre la potencia y disposición de las hormonas circulantes.

Uno de los mayores enzimas que metabolizan drogas y esteroides y que responden a la inducción por Fenobarbital (Pb) es el citocromo P450. Como veremos en el próximo apartado, los isoenzimas del citocromo P450 (relacionado con varias reacciones de la síntesis de cardenólidos) están regulados no solamente por factores hormonales y dietéticos sino también por exposición a xenobióticos, como el Pb, que pueden inducir y/o suprimir isoenzimas específicos de este citocromo.

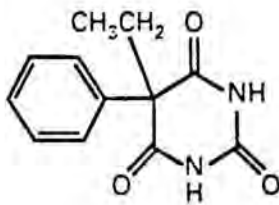
Los primeros estudios efectuados con genes de citocromos P450 pertenecientes a la Familia 2 se llevaron a cabo con animales tratados con fenobarbital. Por esta razón, este grupo fué denominado originalmente como "la familia de P450 inducible por Pb"; ahora sabemos más concretamente que la mayoría de citocromos P450 inducibles por Pb se encuentran entre las subfamilias 2B y 2C (Nebert y Gonzalez,1987).

El Pb, así como un gran número de sustancias químicas estructuralmente relacionadas llamadas "inductores como Pb", pueden también aumentar la expresión de miembros individuales de los P450 2A, tanto en animales de laboratorio como en personas (Morel y col,1990). Estos "inductores como Pb" incluyen el isosafrol, óxido de *trans* estilbeno, pesticidas organoclorados, fenotiazinas, bifenilos halogenados no planares y carcinógenos (Thomas y col,1981; Dannan y col,1983). Algunos de ellos pueden verse en la Figura I-12.

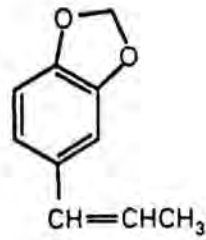
No hay una necesaria correlación entre la clasificación en familias y subfamilias de

FIGURA I-12

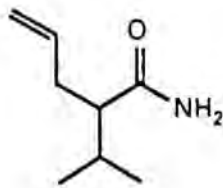
Diversidad estructural de los "inductores como PB"



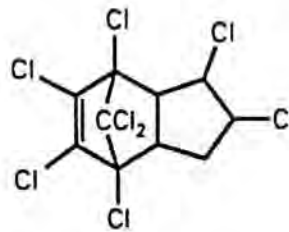
Fenobarbital (PB)



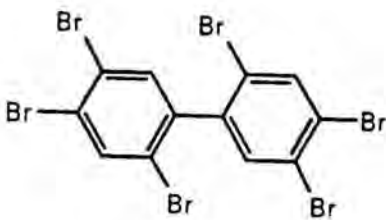
Isosafrol



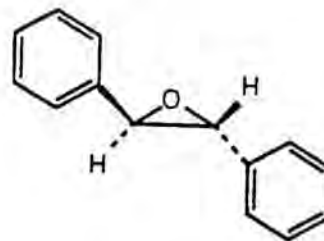
Alilisopropilacetamida



Clordano



2,4,5,2',4',5'-Hexabromobifenil



óxido de *trans*-Estilbeno

INTRODUCCION

genes de los citocromos P450 y sus respuestas a Pb (por ejemplo, P450 2B3 no es inducido por Pb, mientras que los P450 2B1 y 2B2 sí lo son; Labbe y col,1988). Verdaderamente la inducción del Pb no se limita a los citocromos P450, puesto que hay otros enzimas, que contribuyen al metabolismo de compuestos extraños, como la aldehído deshidrogenasa, epóxido hidrolasa, NADPH cit.P450 reductasa, UDP glucuroniltransferasa, etc. que también son inducidas por Pb (Dunn y col,1989; Pickett y Lu,1989).

Los efectos del Pb en el hígado de mamíferos, al contrario de los del 3-metilcolantreno, también incluyen la proliferación del RE liso, aumento del peso del órgano, desdiferenciación celular y una estabilización general de las proteínas microsomales hepáticas, siendo por tanto pleitrópico. Se ha estudiado con detalle la inducción por Pb de los P450 2B microsomales de hígado de rata; la respuesta del citocromo a la inducción puede ser caracterizada como específica y pleitrópica para las sustancias químicas lipofílicas (Waxman y Azaroff,1992; Dimitriadis,1993).

La inducción por Pb del P450 2B se cree que es debida a una activación transcripcional. Se produce una síntesis de proteína 2B como resultado del aumento en los niveles de 2B mRNA establecidos, éstos a su vez son causados por un incremento de la transcripción de los correspondientes genes *CYP2B*. La activación transcripcional es rápida y puede superar 20-50 veces el nivel de transcripción basal. Estas cinéticas de inducción son distintas de las de aquellas que caracterizan la inducción por Pb de los genes de la NADPH citocromo P450 reductasa y de la epóxido hidrolasa, las cuales son también transcripcionalmente activadas por Pb (Hardwick y col,1983). Así, diferentes mecanismos de inducción probablemente caracterizan respuestas individuales de los genes al Pb. La activación transcripcional de la expresión del P450 2B ha sido también observada en el intestino delgado inducido con Pb (Traber y col,1990).

No obstante, no está aún bien establecido el mecanismo de inducción del Pb, y se sugiere que implica tanto pasos transcripcionales como posttranscripcionales. Los posibles mecanismos por los cuales el Pb y los "inductores como Pb" activan la transcripción de los genes P450 2B se consideran más adelante (ver apartado Citocromo P450: Diversidad de mecanismos reguladores).

También ha sido descrito un citocromo P450 mitocondrial inducible por Pb que es estructuralmente e inmunoquímicamente similar al P450 2B1 (Shayiq y Avadhani,1990).

Fonne-Pfister y col.(1988) observaron que la inducción de citocromo P450 en plantas superiores provocada por heridas aumenta en los tejidos tratados con Pb y clofibrato. Otros autores también han visto que el contenido de citocromo P450 aumenta con etanol, Mn, Pb y 2,4-D (Reichhart y col,1980; Adelé y col,1981).

Recientemente, en nuestro laboratorio, se han realizado estudios con cultivos de callo de *Digitalis purpurea* tratados con Pb intentando encontrar una relación entre este efector químico, el citocromo P450 y la síntesis de cardenólidos *in vitro*. Solsona (1992) estudió el efecto producido por una concentración de 80mg/l de Pb en dichos callos y bajo distintas

condiciones; observó que el Pb activa claramente la síntesis de proteínas mitocondriales, microsomales y citocromo P450, también incrementa la actividad de los enzimas NADPH-citocromo P450 reductasa y del complejo enzimático responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol, con todo esto se activa significativamente la síntesis de cardenólidos. Además, la luz, especialmente la blanca, interacciona positivamente con el Pb. También observó que el Pb reduce considerablemente la relación vacuola/citoplasma y estimula el desarrollo del RE y la formación de mitocondrias y microcuerpos.

4.5.2. FACTORES INTERNOS

FACTORES GENETICOS

La regulación de la biosíntesis de cardenólidos viene determinada por el genoma de la planta; en los cultivos *in vitro* éste puede expresarse de forma distinta afectando tanto a la cantidad como a la clase de producto formado.

Hirotsani y Furuya (1977) observaron este hecho en callos de *Digitalis lanata*, en los cuales no encontraron cardenólidos pero sí metabolitos intermediarios. Hagimori y col. (1982a) realizaron estudios similares en *Digitalis purpurea* y también obtuvieron una baja cantidad de cardenólidos que podían modificar al introducir variaciones en el medio de cultivo.

Esta baja capacidad para sintetizar cardenólidos contrasta con los altos niveles hallados de otros esteroides como saponinas o fitoesteroles de membrana (Pilgrim, 1977; Helmbold y col, 1978). Varios autores demostraron que compuestos intermediarios añadidos a cultivos de *Digitalis* podían ser biotransformados en cardenólidos (Furuya y col, 1973; Alferman y col, 1977; Lui y Staba, 1979). De aquí se deduce que los cultivos poseen una gran actividad enzimática para realizar los últimos pasos de la síntesis de cardenólidos.

La elevada capacidad enzimática en los últimos pasos de la síntesis de cardenólidos ha sido además comprobada en cultivos de *Digitalis* en relación a los enzimas 12 β y 16 β hidroxilasa, β -glucosil transferasa, acetil transferasa y los enzimas responsables de las oxidoreducciones implicadas en la formación de la configuración *cis* entre los anillos A y B. Estos enzimas son capaces de transformar a los cardenólidos y llevar a cabo los últimos pasos de la síntesis cuando se adicionan los precursores adecuados.

Según estas observaciones, la interrupción del camino biosintético en los cultivos *in vitro* se daría en los primeros pasos de la síntesis, pero podría continuar si se suministraran al medio los precursores adecuados. Así pues, no se puede dudar de que las células de estos cultivos poseen la capacidad genética para realizar esta síntesis, aunque en estas condiciones esté reprimida (Hirotsani y Furuya, 1977).

INTRODUCCION

Los resultados de las investigaciones realizadas en cultivos de callo de *Digitalis* están de acuerdo en que se acumulan esteroides de 19 y 21 átomos de carbono, y que pueden convertirse en otras sustancias. Caspi y Lewis (1967) demostraron con claridad que la pregnenolona es un intermediario clave en la formación de digitoxigenina y otros cardenólidos (ver en el apartado I.4.4. el esquema de la biosíntesis).

FACTORES MORFOLOGICOS

En las plantas superiores existen ciertos compuestos químicos que sólo se sintetizan o acumulan en órganos o tejidos específicos. Ya que los tejidos de callo o cultivos celulares no tienen la plena capacidad para producir determinados compuestos secundarios, se puede pensar que sea necesaria una diferenciación morfológica de órganos o tejidos específicos para su formación y/o acumulación.

Tabata y col.(1971) demostraron la relación que existe entre diferenciación morfológica y química induciendo la formación de yemas en cultivos indiferenciados de tabaco, para obtener síntesis de nicotina. Otros autores también han observado que cuando se produce diferenciación y organización celular en los cultivos, se da concomitantemente síntesis de los productos secundarios correspondientes (Czygan,1975; Pearson,1978); sin embargo también se conocen casos en los que se ha producido diferenciación química sin presentarse una diferenciación morfológica (Sugisawa y Ohnishi,1976).

Como veremos más adelante en el apartado I.4.6.2.2. (Organogénesis), se han realizado numerosos estudios encaminados a determinar si la morfogénesis, en cultivos de tejidos, es un requisito esencial para la biosíntesis de metabolitos secundarios *in vitro*.

CITOCROMO P450

Los citocromos P450 son las oxidasas terminales de un gran número de biotransformaciones.

La biosíntesis de cardenólidos incluye reacciones de hidroxilación muchas de las cuales tienen lugar por la acción de monooxigenasas no específicas dependientes del citocromo P450. Uno de los pasos biosintéticos que se encuentran limitados para la producción de cardenólidos en cultivos *in vitro* es la rotura de la cadena lateral del colesterol cuya reacción se debe a dos monooxigenasas mitocondriales dependientes del cit.P450 (P450_{scc}).

A) Generalidades

El término citocromo P450 hace referencia a un grupo de hemoproteínas que en su

INTRODUCCION

forma reducida (Fe^{2+}), forman un complejo con CO y muestran un espectro de absorción con un máximo alrededor de 450nm. El complejo es fotodisociable cuando se irradia a 450nm (Kuthan y Ulrich, 1982) y la banda de absorción baja rápidamente a 420nm al desnaturalizarse el citocromo (Ulrich y Duppel, 1975).

Estos enzimas son monooxigenasas en su mayor parte, aunque algunos miembros de la familia también catalizan reacciones de transferencia de oxígeno no usuales; actúan conjuntamente con la NADPH citocromo P450 reductasa y llevan a cabo muchos procesos bioquímicos, incluyendo la degradación de xenobióticos y la biosíntesis de hormonas esteroideas, ácidos grasos y prostaglandinas.

Los enzimas del citocromo P450 fueron descubiertos en 1950 y años posteriores como fruto de los resultados obtenidos en varias líneas de investigación sobre la naturaleza de los enzimas implicados en la oxidación de drogas, carcinógenos y esteroides, y de los estudios sobre pigmentos presentes en el retículo endoplasmático del hígado. Se encuentran en fuentes biológicas tan diversas como microorganismos, plantas y animales (Guengerich, 1992a). Actualmente se reconoce que los citocromos P450 constituyen una familia de múltiples genes que incluye numerosos enzimas, de los cuales más de 150 ya han sido caracterizados; casi todos estos genes tienen características individuales de regulación y especificidad catalítica variando desde un 10 hasta un 90% en la identidad de la secuencia de aminoácidos.

Imai y Sato (1974) y Van der Hoeven y col. (1974) fueron los primeros en purificar el citocromo P450 por electroforesis. Estudios inmunológicos posteriores han revelado que las preparaciones purificadas de citocromo P450 no son siempre homogéneas y pueden contener dos o más isoenzimas (Dean y Coon, 1977).

El mínimo peso molecular atribuido al citocromo P450 en presencia de agentes reductores y desnaturalizantes se encuentra comprendido entre los 46 y 57 kDa (Lu y Miwa, 1980). Posteriormente se han aislado diversos isoenzimas del citocromo P450 y se han determinado los pesos moleculares, así por ejemplo Althaus y Meyer (1981) a partir de la fracción microsomal de hepatocitos de embrión de pollo obtuvieron los siguientes pesos moleculares (Pm) correspondientes a tres isoenzimas del citocromo P450: 52, 54 y 56 kDa; Bornheim y Correia (1986) a partir de la fracción microsomal de hepatocitos de rata determinaron 4 isoenzimas con Pm de 51,9 y 52,5 kDa; James (1990) aisló tres proteínas del citocromo P450 a partir de los microsomas del hepatopáncreas del cangrejo de mar (*Panulirus argus*) con Pm de 52,5, 53 y 51,5kDa, y Gupta y col.(1990) caracterizaron 4 isoenzimas del P450 de la fracción microsomal de hígado de gallina adulta inducido con β -naftoflavona, con Pm de 54 y 56kDa.

La Tabla I-2 recoge los pesos moleculares del citocromo P450 y la NADPH citocromo P450 reductasa encontrados por diversos autores en varios animales y plantas.

La naturaleza hemoproteica del citocromo P450 fué demostrada por vez primera por Omura y Sato (1964). El hierro posee seis enlaces, cuatro de ellos están coordinados con los nitrógenos pirrólicos y Gotoh y col.(1983) propusieron que uno de los dos enlaces restantes

INTRODUCCION

TABLA I-2 : Pesos moleculares de isoencimas del citocromo P450 y de la NADPH-citocromo P450 reductasa que se han aislado en animales y plantas.

CITOCROMO P450

<u>Procedencia</u>	<u>Peso molecular de las proteínas aisladas</u>	<u>Referencias</u>
Microsomal (Hepatocitos de embrión de pollo)	52kD 54kD 56kD	Althaus y Meyer (1981)
Microsomal (Bulbos de tulipán, <i>Tulipa gesneriana</i>)	52,5kD	Higashi y col. (1985)
Microsomal (Hepatocitos de rata)	51,9kD 52,5kD	Bornheim (1986) y Correia
Microsomal (<i>Glycine max</i>)	55kD	Kochs y Grisebach (1989)
Microsomal (Hepatocitos gallina adulta)	54kD 56kD	Gupta y col.(1990)
Microsomal (Hepatopáncreas cangrejo de mar)	51,5kD 52,5kD 53kD	James (1990)
Microsomal (<i>Helianthus tuberosus</i>)	57kD	Gabriac y col.(1991)
Microsomal (<i>Catharanthus roseus</i>)	56kD	Vetter y col.(1992)
NADPH-CITOCROMO P450 REDUCTASA		
Mamíferos	76-78kD	Yasukochi y Masters (1976)
Microsomal (Levadura)	83kD	Aoyama y col.(1978)
Microsomal (<i>Digitalis lanata</i>)	80kD	Petersen y Seitz (1988)
Microsomal (embriones maíz, plántulas <i>Vicia sativa</i> , células suspensión <i>Catharanthus</i>)	80-84kD	Benveniste y col.(1991)
(tubérculos patata, aguacate, células suspensión Veronica y trigo)	80-84kD	Benveniste y col.(1991)
Microsomal (<i>Vigna radiata</i>)	82kD	Shet y Estabrook (1992)

era un residuo de cisteína, hecho que fué comprobado después por Anders (1985); la naturaleza del sexto enlace no está bien establecida pero se cree que consiste en una molécula de agua ya que es fácilmente intercambiable (White y Coon, 1982).

Los citocromos P450 poseen una extensión hidrofóbica N-terminal que contribuye en mayor grado al anclaje del enzima en la membrana (Monier y col, 1988; Vergeres y col, 1989), un lugar de unión al sustrato y uno o varios sitios de interacción con la NADPH citocromo P450 reductasa que son poco conocidos (Edwards y col, 1984; Nelson y Strobel, 1988).

B) Nomenclatura sistemática

Se han obtenido datos concluyentes de las múltiples formas del P450, pero no se sabe si existen diferentes isoformas en diversas especies o tejidos.

Los nombres que se asignaban estaban basados en las fuentes de procedencia utilizadas o en propiedades espectrales, movilidad electroforética, sustratos o inductores, o en ciertos modelos de números y letras que se asignaban en serie. Todo esto resultó inadecuado a medida que se fueron aislando nuevas isoenzimas; igual sucedió con la nomenclatura basada en las reacciones catalizadas, ya que un mismo citocromo utilizaba distintos sustratos y en algunos casos distintos productos o diversas reacciones químicas.

Al conocer mejor los citocromos P450 y en particular su secuencia de aminoácidos, determinada directamente o pronosticada a partir de sus cDNAs, se vió que lo más útil sería una nomenclatura general basada en su similitud en la secuencia de aminoácidos.

Fuó el Dr. Daniel W. Nebert quién propuso tal sistema, y actualmente ha sido adoptado de modo extenso: Aquellas proteínas P450 de cualquier procedencia con una secuencia de aminoácidos idéntica en un 40% o más se incluyen en la misma familia, y se designan por un número arábigo; aquellas con una identidad mayor del 55% se incluyen en la misma subfamilia y se designan por una letra mayúscula. Los genes individuales y sus productos (los enzimas) son después asignados con números arbitrariamente. En el momento presente hay 28 familias distintas de genes, de las cuales 11 está pronosticado que existen en todos los mamíferos. A modo de ejemplo, el mayor citocromo inducido por Pb en los microsomas de hígado de conejo se llamó originariamente P450 LM2, ahora ha sido asignado a la familia 2 y subfamilia B; y el gen y el enzima se denominan *CYP2B4* y *CYP2B4* respectivamente. El enzima también puede ser denominado P450 2B4.

La denominación P450 todavía se utiliza, aunque fué acuñada para describir un pigmento rojo de función desconocida que poseía un espectro de absorción con un máximo alrededor de 450nm, más tarde se demostró que estaba implicado en la oxidación de drogas y esteroides. Sin embargo el término citocromo es impropio, ya que en la mayoría de reacciones los citocromos catalizan funciones como las oxigenasas más bien que como portadores de electrones (Coon y col, 1992).

INTRODUCCION

La superfamilia P450 es muy antigua, probablemente existe desde hace 1,5 billones de años, y se ha desarrollado con una evolución divergente (Nebert y Gonzalez, 1987), como se aprecia por la homología estructural.

C) Características

1) El sistema monooxigenasa dependiente del citocromo P450 efectúa el metabolismo de numerosas sustancias químicas, endógenas o exógenas, y que aparentemente no tienen características estructurales o fisicoquímicas comunes.

2) La mayoría de los enzimas del citocromo P450 de eucariotas se localizan en las membranas, mayormente en el retículo endoplasmático y con frecuencia en la mitocondria. La topología de la membrana del citocromo P450 ha pasado de una en la cual podía haber muchos segmentos transmembrana, como se creía anteriormente, a otra en la cual la proteína está anclada en la membrana sólo por uno o dos péptidos (Black, 1992) (Figuras I-13 e I-14).

3) No se encuentra uniformemente distribuido por toda la membrana microsomal, cada isoenzima se puede localizar en varios lugares de la membrana y el grado de especificidad frente a un sustrato puede depender de las particularidades de cada región. Los citocromos P450 microsomales se encuentran fuertemente anclados a la membrana mediante interacciones hidrofóbicas.

La comprensión de estos sistemas enzimáticos ha sido facilitada enormemente por el trabajo con modelos bacterianos. El poder disponer de grandes cantidades de una forma soluble bacteriana de citocromo P450 (P450 101 o P450cam) ha permitido un gran número de estudios biofísicos incluyendo la cristalización y determinación de la estructura tridimensional del enzima (Poulos y Raag, 1992). La Figura I-15 representa el concepto tridimensional del sistema monooxigenasa en el retículo endoplasmático.

4) Su papel principal es la monooxigenación de las sustancias lipófilas (monooxigenasas).

5) Constituyen el único mecanismo bioquímico capaz de atacar una unión carbono-hidrógeno no activada.

6) El citocromo P450 forma parte de una cadena de transporte de electrones (como la cadena respiratoria mitocondrial), pero en lugar de producir energía oxida sustancias propias y extrañas al organismo.

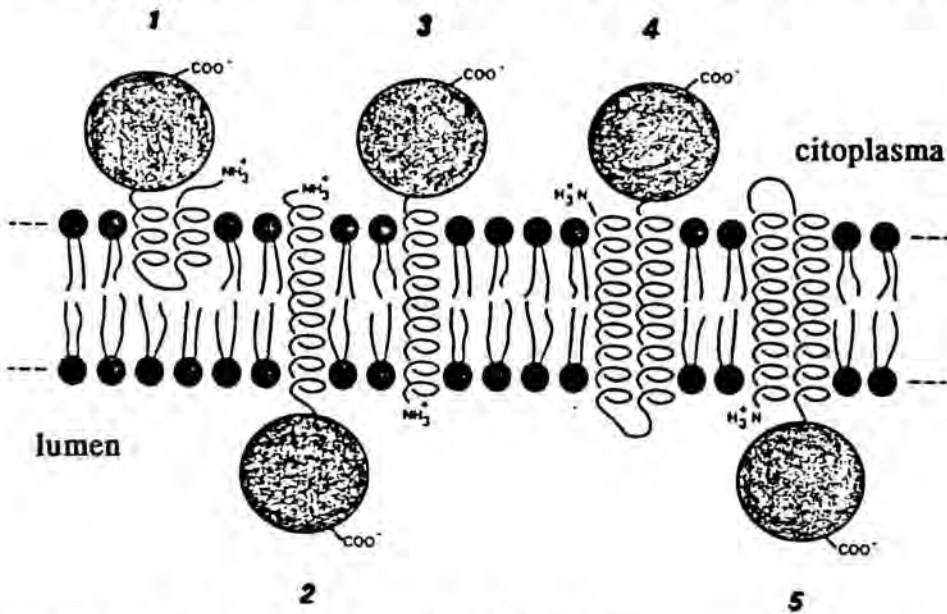
7) Posee la facultad para actuar como transferidor de electrones y además como oxidasa durante el proceso de la monooxigenación.

8) El sistema está presente en todos los organismos eucariotas y en algunos procariotas. Se ha estudiado especialmente en animales.

INTRODUCCION

FIGURA I-13

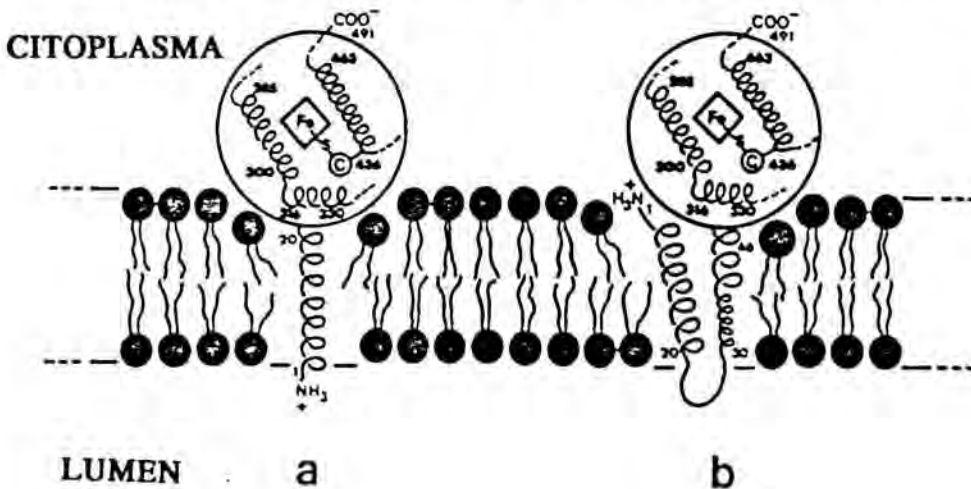
Posibles topologías de la membrana para los citocromos P450 de mamíferos.



1,2 y 3 = casos de una sola inserción en la membrana;
4 y 5 = dos uniones, inserción a modo de "horquillas".

FIGURA I-14

Topología de la membrana para el citocromo P450 2B4 microsomal.



Los modelos a y b corresponden respectivamente a los modelos 3 y 4 de la Figura I-13.

INTRODUCCION

9) Los enzimas dependientes del citocromo P450 se dividen en dos clases (Stewart y Schuler, 1989):

a) Mitocondriales : llevan a cabo hidroxilaciones implicadas en la biosíntesis de esteroides y se regulan por hormonas.

b) Microsomales : implicados en procesos de detoxificación y reacciones catabólicas en general.

10) La distribución de los distintos isoenzimas del citocromo está controlada genéticamente, pero también se puede modificar por factores hormonales, dietéticos, ambientales y otros.

11) Todos los citocromos P450 presentan una elevada hidrofobicidad, un número parecido de residuos aminoácidos y un número similar de residuos básicos.

12) Recientemente se ha progresado en la relación estructura-función de las proteínas del citocromo P450 utilizando mutagénesis dirigida localmente. Se han manipulado regiones de cambio y se han sustituido bases simples para deducir los papeles críticos de algunos residuos de aminoácidos (Johnson y col, 1992)

D) Componentes del sistema

Las monooxigenasas dependientes de citocromo P450 son complejos multienzimáticos formados esencialmente por :

- El dador de electrones: el NADPH.
- El enzima que cede los electrones desde el NADPH hasta el citocromo P450: la NADPH citocromo P450 reductasa.
- El enzima que se une al substrato y sirve como oxidasa terminal: el citocromo P450.
- La presencia de fosfolípidos (Imaoka y col, 1988; Halvorson y col, 1990).

Estas reacciones necesitan la participación de dos electrones que se transfieren desde la forma reducida de los nucleótidos de piridina (NADPH en P450 mitocondrial y microsomal) hasta el cit.P450; éste sólo puede aceptar un electrón, por lo cual, la NADPH cit.P450 reductasa deba ser capaz de almacenar el segundo electrón de modo que sea prácticamente insensible al oxígeno molecular (Figura I-16).

Existen dos tipos de cadena de transporte de electrones hasta el cit.P450:

1) Microsomal: El sistema está inmerso en la membrana del retículo endoplasmático de la mayoría de células eucariotas y se distribuye asimétricamente con la reductasa y el P450 especialmente en la cara citoplasmática de dichas membranas (Peterson y col, 1978).

INTRODUCCION

Esta cadena de transporte microsomal tiene las siguientes características :

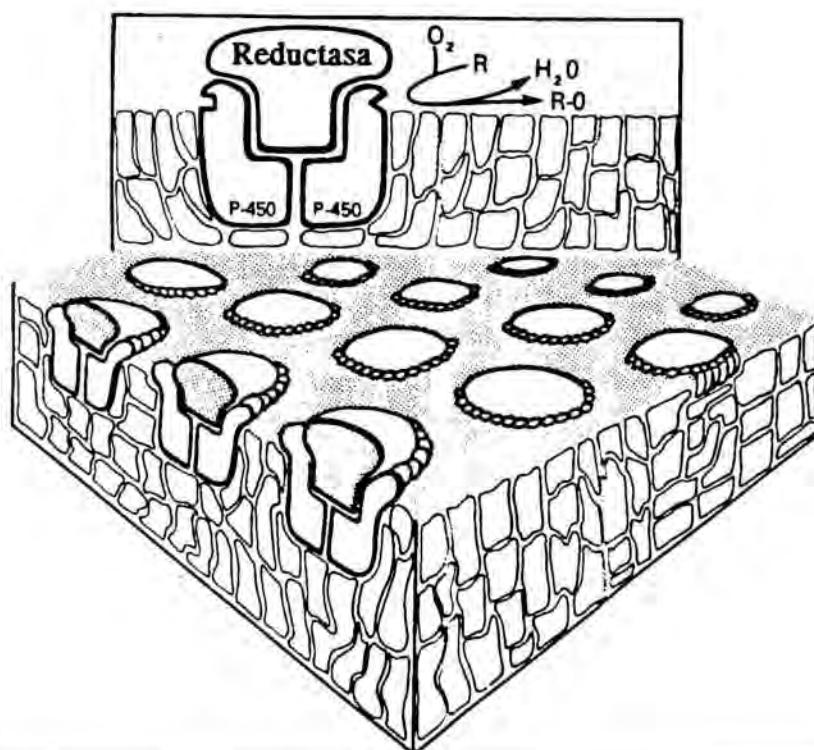
a) Utiliza NADPH como fuente de reducción.

b) La NADPH cit.P450 reductasa está compuesta por una cadena polipeptídica simple con un peso molecular entre 70 y 80 kDa (Charles y Williams,1976). Está formada por una flavoproteína compleja y su grupo prostético que consta de una molécula de FAD y una de FMN en cantidades equimolares (Yasukochi y Masters,1976). Esta reductasa acepta dos electrones del NADPH y los transfiere uno al citocromo P450 ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) y el otro al complejo que se forma con el Fe^{3+} y que llevará a la rotura del enlace dioxígeno. Una característica interesante de este enzima es su gran estabilidad en su forma reducida con un electrón (Yasukochi y col,1979). La reductasa se une a la membrana mediante un segmento hidrofóbico en la porción N-terminal de la proteína de unos 6.100 daltons (Black y col, 1979), sin esta porción el enzima es incapaz de reducir al citocromo P450.

c) Contiene un citocromo que es exclusivo de este sistema membranoso y que no se encuentra en la mitocondria. Durante la última reacción de esta secuencia de transporte

FIGURA I-15

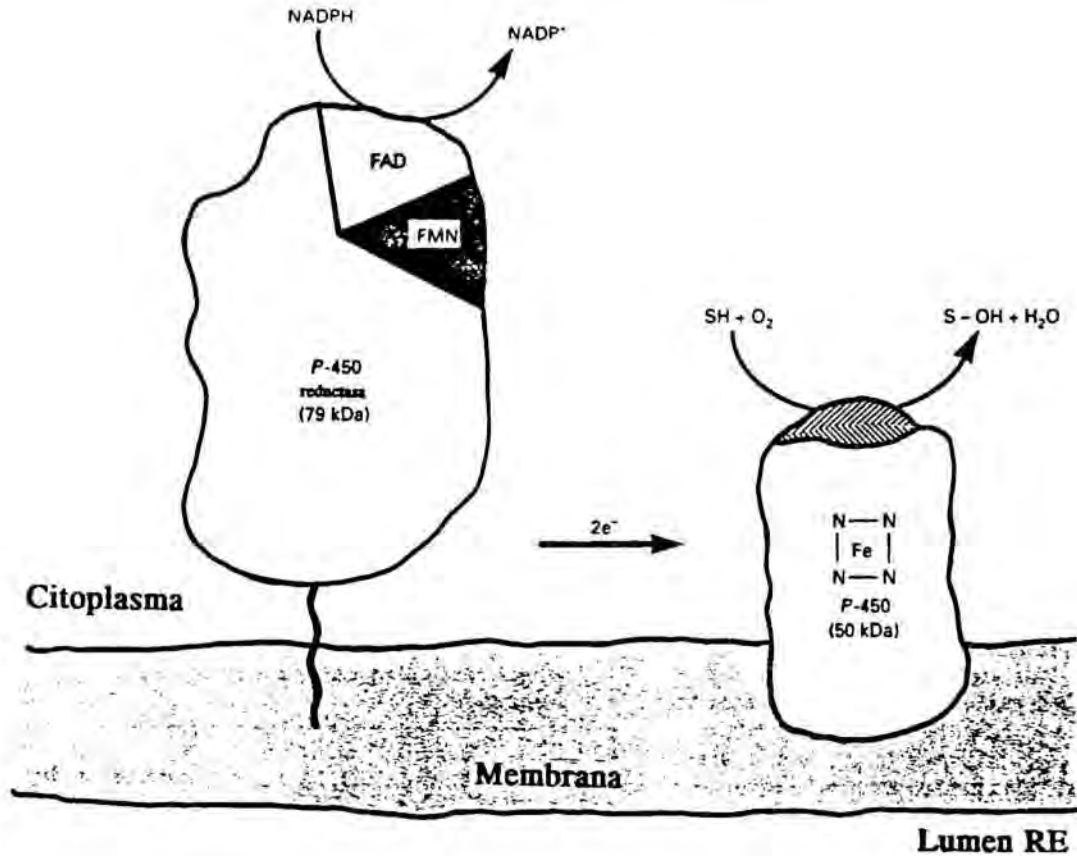
Concepto tridimensional del sistema monooxigenasa en el retículo endoplasmático.



INTRODUCCION

FIGURA I-16

Hidroxilación de sustratos lipófilos (SH) catalizada por los enzimas del citocromo P450 unido a la membrana microsomal.



Un total de 2 electrones, procedentes del NADPH, se transfieren desde la flavoproteína P450 reductasa a la hemoproteína P450. La reacción de monooxigenación transcurre en el lugar activo del citocromo P450, e implica la incorporación en el sustrato de un átomo de oxígeno derivado del oxígeno molecular (O_2). Los lugares activos del P450 y su reductasa están orientados hacia el citoplasma. Los sustratos incluyen drogas, polucionantes, esteroides y ácidos grasos.

RE = retículo endoplasmático.

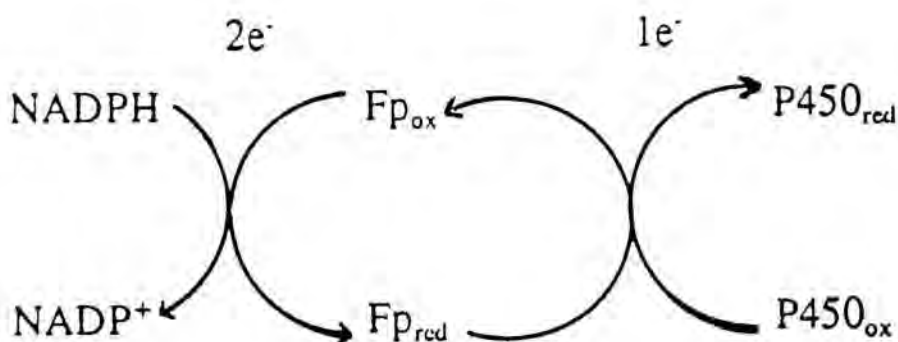
de electrones el Fe^{2+} del cit.P450 reacciona con O_2 molecular para formar el complejo cit. $Fe^{2+}-O_2$. Después uno de los átomos de oxígeno es introducido en el sustrato en una reacción de hidroxilación mientras que el otro oxígeno se reduce a agua (ver Figura I-21).

d) No es una cadena fosforilante pues no se produce ATP.

INTRODUCCION

FIGURA I-17

Cadena de transporte de electrones microsomal.



Fp = Flavoproteína constituyente de la NADPH citocromo P450 reductasa.

e) El fin primario de este sistema es la hidroxilación de diversos fármacos (p.e. fenobarbital), esteroides, ácidos grasos, hidrocarburos policíclicos y algunos aminoácidos.

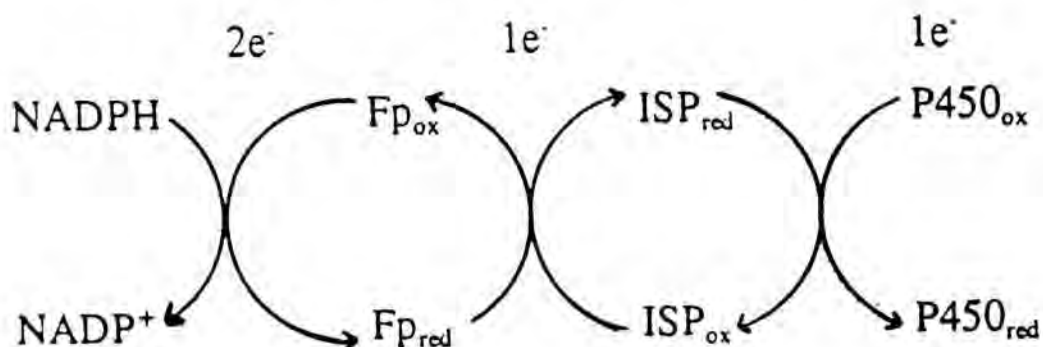
f) De hecho, la síntesis de componentes de la secuencia de transporte electrónico microsomal es inducida en el hígado a partir de la administración de ciertos fármacos u otros substratos de este sistema.

La Figura I-17 representa esquemáticamente la cadena de transporte de electrones microsomal.

2) Mitocondrial: El ciclo en las mitocondrias implica dos pasos separados de

FIGURA I-18

Cadena de transporte de electrones mitocondrial.



Fp = Flavoproteína de la NADPH citocromo P450 reductasa.
ISP = Proteína ferrosulfúrica.

INTRODUCCION

transferencia de electrones. El sistema está también sumergido en la membrana, que proporciona un ambiente hidrofóbico. Tiene las siguientes características :

a) Los electrones se transfieren del NADPH al citocromo P450 por la NADPH citocromo P450 reductasa mitocondrial (uno de los citocromos mitocondriales más interesantes es el citocromo P450_{scc}, responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol).

b) La reductasa consta de una flavoproteína que contiene FAD, éste cede los electrones de uno en uno a una proteína ferrosulfúrica que sirve de lanzadera entre la reductasa y el citocromo P450 (Figura I-18). Tanto la reductasa como esta ferroproteína y los citocromos P450 relacionados con este proceso se sintetizan en el citosol como preproteínas y luego son transportados a la mitocondria donde adquieren su forma final madura (Watterman y col,1986) (ver más adelante en el apartado citocromo P450_{scc}). Parece ser que la NADPH citocromo P450 reductasa mitocondrial es algo distinta de la microsomal así como los grupos prostéticos que utiliza son también distintos.

La actividad de un gran número de enzimas ligados a la membrana depende del tipo de fosfolípido que los rodea (Coleman,1973). Las interacciones entre los fosfolípidos y los enzimas son relativamente poco específicas, pero cuando se observa más especificidad ésta se basa principalmente en la carga de los fosfolípidos (Brown y Cunningham,1982). Parece que los fosfolípidos poseen otras funciones en el sistema de las monooxigenasas además de facilitar la asociación reductasa-citocromo P450; se ha comprobado que pueden renaturalizar el citocromo P450 que se haya destruído durante el proceso de extracción (Ingelman-Sunberg 1977) y aumentar la estabilidad y la rigidez conformacional de los citocromos P450 microsomal (Archaov y col,1980) y mitocondrial (Hall y col,1979).

E) Diversidad de reacciones catalizadas

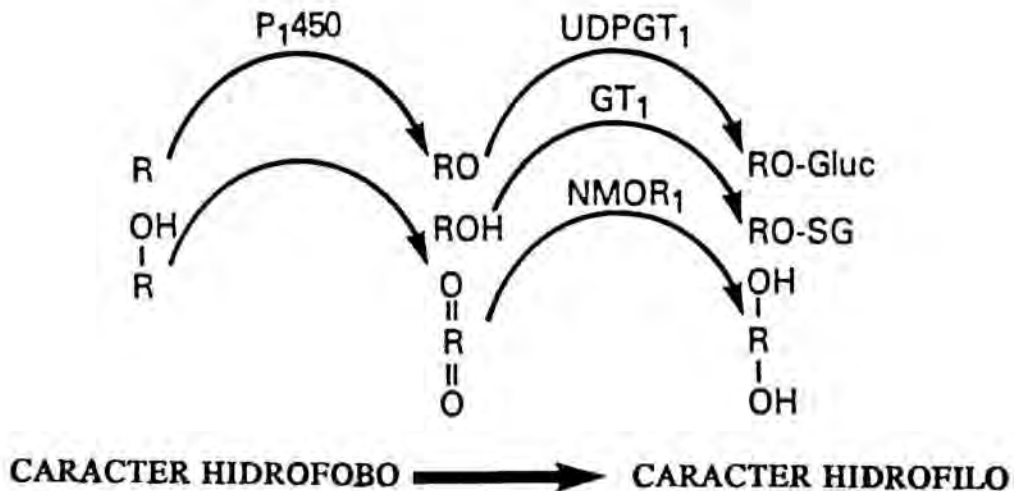
La superfamilia de genes del citocromo P450 incluye muchas isoformas que son poco frecuentes en cuanto a la variedad de las reacciones químicas catalizadas y del número de substratos acometidos. Algunas de las isoformas del citocromo P450 son completamente específicas para escoger sus substratos, pero la mayoría, y particularmente las del RE, catalizan un amplísimo número de reacciones químicas con un número casi ilimitado de substratos biológicos y compuestos xenobióticos. Entre estos últimos se encuentran las sustancias químicas sintéticas del ambiente, que actualmente se estiman alrededor de 250.000, la mayoría de las cuales son substratos potenciales del citocromo P450 si no son inductores o inhibidores de los citocromos individuales. Los diferentes Pm de los substratos del P450 son algo remarcable: desde cromato y etanol hasta esteroides e hidrocarburos aromáticos policíclicos de cinco anillos.

Los enzimas citocromo P450 representan la Fase I del metabolismo en el cual el substrato es oxigenado. Los enzimas de la Fase II a menudo usan el oxígeno como lugar de acción para posteriores metabolismos (como glucuronidación, conjugación con sulfato,

INTRODUCCION

FIGURA I-19

Esquema de la regulación coordinada entre las Fases I y II para dar productos inocuos altamente polares en las células. Este mecanismo es el responsable del metabolismo y posterior eliminación de los contaminantes ambientales por el citocromo P450 1A.



P_{1450} = P450 1A

$UDPGT_1$ = UDP glucuroniltransferasa

$NMOR_1$ = NAD(P)H menadiona oxidoreductasa

GT_1 = glutatión transferasa

glutatión o glicina). La detoxificación generalmente requiere los enzimas de la Fase I y la Fase II.

La investigación sobre el citocromo P450 se ha desarrollado rápidamente en los últimos años, debido a que, como ya hemos mencionado, estos isoenzimas juegan grandes papeles en el metabolismo de un número importante de sustancias químicas, incluyendo drogas, carcinógenos, esteroides, pesticidas, hidrocarburos y productos naturales. Es bien conocido, que la toxicidad de estos compuestos puede ser modificada, no siempre en sentido decreciente, por varias oxidaciones catalizadas por los enzimas del citocromo P450. El punto común de estas reacciones oxidativas es la inserción de un oxígeno atmosférico en el sustrato, produciendo a menudo un intermediario inestable que se rompe dando el producto final.

Dependiendo de la formación de intermediarios reactivos, de la presencia de enzimas de la Fase II (epóxido hidroxilasa, UDP glucuroniltransferasa, glutatión transferasa, sulfotransferasa) y de la estabilidad química del intermediario, existen dos mecanismos

sulfotransferasa) y de la estabilidad química del intermediario, existen dos mecanismos posibles. El primero puede llevar a posteriores procesos metabólicos (como hidrataciones, o conjugaciones con ácido glucurónico, glutatión o sulfato) y excreción de productos inocuos altamente polares de las células; implicaría la coordinación de la Fase I y la Fase II, como puede verse en la Figura I-19. El segundo puede dar lugar a uniones covalentes, de intermediarios oxigenados, a proteínas (incluyendo las propias proteínas P450) y a ácidos nucleicos. Este camino se ha demostrado que está relacionado con la carcinogénesis química, mutagénesis, toxicidad de drogas y teratogénesis, y entre otras causas supondría la ausencia de enzimas de la Fase II. Todos estos estudios se han venido realizando en animales (Nebert y Gonzalez, 1987).

En años recientes se ha prestado atención al papel de estas enzimas en el metabolismo de compuestos endógenos como esteroides, vitaminas liposolubles, ácidos grasos y alcaloides de mamíferos. Alteraciones en las actividades del citocromo P450 hacia algunos de estos sustratos han sido ya relacionadas con enfermedades que afectan a la salud del hombre. Es de destacar que uno de los mayores grupos de sustratos endógenos para los enzimas del citocromo P450 es el ácido araquidónico y sus derivados (Capdevila y col, 1992). En la Figura I-20 pueden verse diversas reacciones catalizadas por los enzimas P450.

Yang y col. (1992) hablan de la influencia de la nutrición sobre la función de los enzimas del citocromo P450.

Maenpaa y col. (1993) han encontrado isoformas del citocromo P450 en tejido fetal humano que están relacionadas con las isoformas P450 inducibles por Pb en el ratón.

Por último, con la caracterización de los enzimas del citocromo P450 humano se puede ver que diferencias en el "pool" total de este citocromo entre individuos pueden tener efectos dramáticos sobre la eficacia y toxicidad de las drogas en el hombre (Guengerich, 1992b).

F) Diversidad de mecanismos catalíticos

Todos los citocromos P450 contienen una fotoporfirina con un grupo hemo unido covalentemente con un cisteinil tiolato a una apoproteína hidrofóbica. La unión del sustrato inicia un complejo ciclo redox que culmina con la formación de un grupo ferriloxo ($\text{Fe}=\text{O}$)³⁺ que transfiere oxígeno al sustrato. Mientras el mecanismo entero es bien conocido, los principios que gobiernan la estereoespecificidad y la regioselectividad del ataque oxidativo permanecen todavía oscuros.

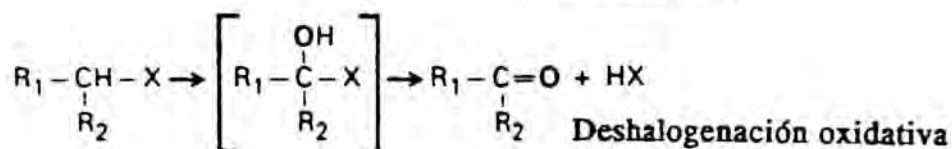
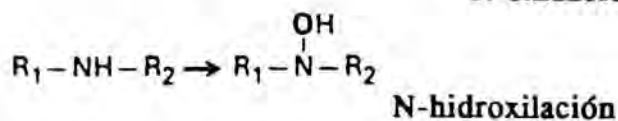
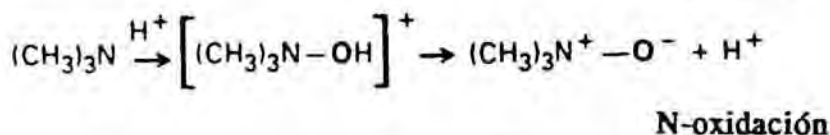
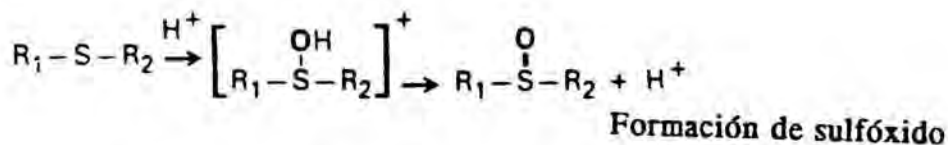
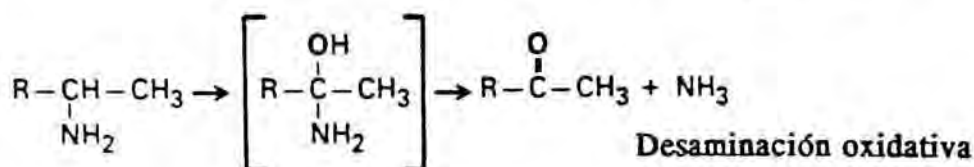
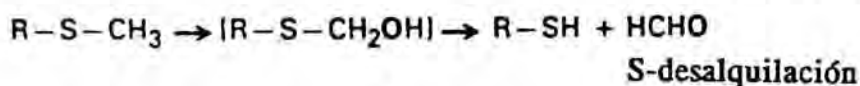
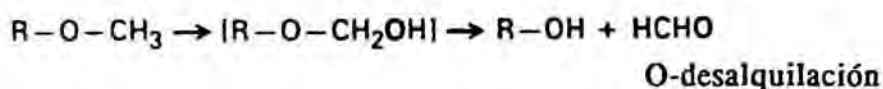
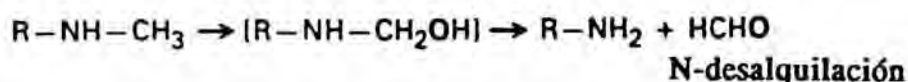
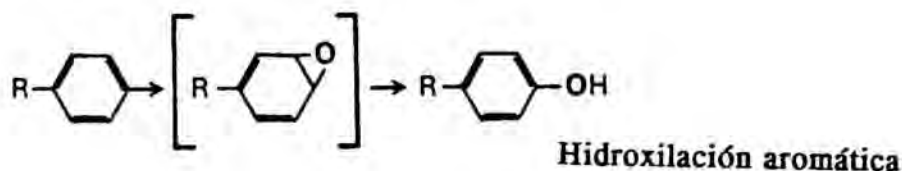
Los pasos implicados en la reducción, catalizada por P450, de un oxígeno molecular con la incorporación de un átomo de oxígeno dentro del sustrato (RH) para dar el correspondiente producto (ROH) se muestran en la Figura I-21. El esquema está basado en uno propuesto recientemente con varias modificaciones (White y Coon, 1980; Coon y col, 1992). Se ha escrito recientemente sobre la activación del sustrato y del peróxido



INTRODUCCION

FIGURA I-20

Ejemplos de diversas reacciones catalizadas por los enzimas P450. El oxígeno procedente de la atmósfera está señalado en trazo más grueso.



INTRODUCCION

(Guengerich,1991; Porter y Coon,1991; Ortiz de Montellano,1989), y un artículo de White (1991) ha remarcado la implicación de los radicales libres en el mecanismo de acción del P450 y otras monooxigenasas.

En la Figura I-21 se puede observar la variedad de productos de la reducción del O₂ que no están acoplados a la hidroxilación del sustrato, como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y, en la reacción 4-electrón NADPH oxidasa, el agua. También aparece la conocida reacción en serie del peróxido, en la cual un compuesto peróxido, como un alquilperóxido o un perácido, da el átomo de oxígeno para la hidroxilación del sustrato sin necesidad de oxígeno molecular o de NADPH como dador de electrones; y se ve la habilidad del Fe²⁺ del P450 para dar electrones de forma secuencial lo que permite reacciones bajo condiciones anaerobias.

Ortiz de Montellano y Reich (1986) indicaron las propiedades no frecuentes que permiten contribuir al citocromo P450 en la regulación de sus propias actividades; éstas incluyen la inhibición competitiva por muchos sustratos alternativos, algunos casos de mecanismos de inactivación, y la estimulación o inhibición por compuestos que actúan como efectores.

Otros ejemplos que se pueden ver en la Figura I-21 son: la rotura reductiva de hidroperóxidos xenobióticos e hidroperóxidos lipídicos (R'LOOH) con formación de hidrocarburos (Vaz y Coon,1987) y la conversión, dependiente de citocromo P450, de ciclohexano carboxialdehído a ciclohexeno con pérdida de un carbono aldehídico (Vaz y col, 1991).

La degradación de xenobióticos por el citocromo P450 es un proceso con múltiples pasos: la molécula es primero hidroxilada, más tarde forma un conjugado con ácido UDP-glucurónico, sulfato o glutatión, y por último es excretada del cuerpo. Algunos compuestos son también convertidos en formas tóxicas o carcinógenas por estas hemoproteínas durante este proceso (Wolf,1982). La toxicidad de los xenobióticos puede aumentar debido a su insólito metabolismo lento o rápido, según el sistema oxidasa de acción mixta del huésped. La diversidad funcional de este sistema oxidasa es atribuible a la presencia de un gran número de isoenzimas que forman parte de esta familia de hemoproteínas, y a que poseen una limitada pero solapada especificidad por el sustrato.

Varios grupos de investigadores (Yoshida y col,1990; Fischer y col,1991) han propuesto un papel para el oxígeno derivado del peróxido en la desmetilación de esteroides catalizada por P450. Muchos otros aldehídos también sufren esta reacción de rotura, particularmente aquellos con cadenas poco ramificadas como el citronelal (Roberts y col, 1991).

Estudios con modelos biomiméticos han dado un conocimiento profundo sobre intermediarios inestables si bien están implicados en los mecanismos catalíticos del citocromo P450 y otras oxidasas. Se han observado semejanzas entre los enzimas del P450 y otras hemoproteínas por Hollenberg (1992) y Ortiz de Montellano y col.(1992).

INTRODUCCION

Como resumen podemos anotar los pasos principales del ciclo catalítico del P450 que se muestra en la Figura I-21 (Ulrich,1979; White y Coon,1980; Guengerich y Macdonald, 1984; Coon y col,1992):

1. Unión del sustrato (RH).

2. Transferencia del primer electrón : Una vez formado el complejo sustrato-citocromo, éste puede aceptar un electrón de la NADPH citocromo P450 reductasa con la consiguiente reducción del citocromo a su forma ferrosa (Peterson y col,1977). Los electrones proceden, en última instancia, del NADPH en los citocromos P450 microsomales y mitocondriales.

Aún no está claro si se forma un complejo estable reductasa-citocromo P450 o si hay una forma transitoria del complejo por las colisiones al azar sobre la membrana. Sí se sabe que las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en el enlace de las dos proteínas (Nadler y Strobel,1988). Específicamente, los residuos carboxil sobre la reductasa están implicados en la unión al citocromo P450, los aminoácidos involucrados sirven de ancla a la región FMN de la reductasa para hacer accesible la superficie a los aminoácidos del citocromo P450 cargados positivamente, de este modo orientan la región FMN dadora de electrones hacia un supuesto aceptor situado en la molécula del citocromo P450 para la reducción del Fe hemo (Nadler y Strobel,1991).

3. Unión del oxígeno molecular : es el primer paso de la activación del oxígeno molecular, la reacción es reversible y puede ser desplazada por CO. Los distintos isoenzimas del citocromo P450 tienen diversas afinidades por el oxígeno (Coon y col,1992). Si un electrón del Fe reducido del grupo hemo del citocromo se transfiere al oxígeno, éste se activa y puede ser incorporado al complejo oxiferrocitocromo P450-sustrato.

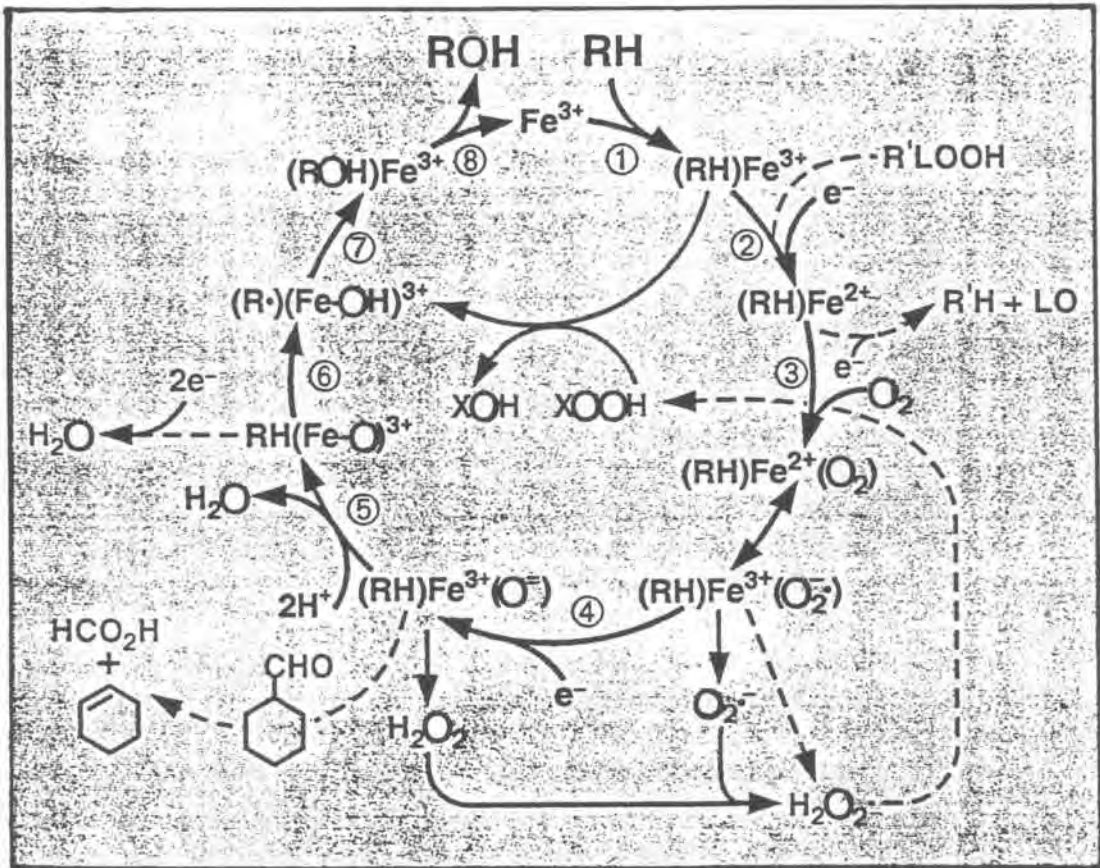
4. Transferencia del segundo electrón : parece que esta transferencia desde la NADPH citocromo P450 reductasa debe ser rápida pues sino el complejo con el oxígeno se puede disociar en citocromo P450 forma ferrosa y anión superóxido. Debido a esta transferencia se forma el enlace dioxígeno (O-O).

5. Heterólisis de la unión O-O y formación de agua : Por rotura reductiva del enlace dioxígeno se genera el complejo catalítico con el oxígeno, pues se cree que en las especies catalíticamente activas un único átomo de oxígeno está unido al Fe del grupo prostético hemo (Ortiz de Montellano,1986).

6. Abstracción del átomo de hidrógeno del sustrato.

FIGURA I-21

Esquema del mecanismo de acción propuesto para el citocromo P450.



RH = sustrato; ROH = producto; R'LOOH = lípido hidropéroxido;
 R'H = producto de reducción (alcano); LO = producto de reducción (oxoácido);
 XOOH = peróxido (dador alternativo de oxígeno molecular).

INTRODUCCION

7. Transferencia del segundo átomo de oxígeno al sustrato: El oxígeno, activado por las monooxigenasas P450 se transfiere al sustrato. Las reacciones de oxigenación incluyen hidroxilaciones de C,N,S,etc., desalquilaciones de aminas y éteres y epoxidaciones. Una sola proteína puede catalizar todos estos tipos de reacciones según el sustrato con el que se encuentra (Guengerich,1991).

8. Disociación del producto : aparentemente tiene lugar antes de empezar un nuevo ciclo de reacción, ya que no se observan dioles en las hidroxilaciones de alcanos.

Como se sabe, las transferencias de los electrones desde la reductasa siguen una de las dos cadenas de transporte vistas anteriormente.

En la Figura I-23 pueden verse varias isoformas del citocromo P450 y la posible relación con otros citocromos.

G) Diversidad de mecanismos reguladores. Inductores e inhibidores.

La administración de sustancias químicas estructuralmente diversas induce a un aumento en el nivel de una o más isoformas del citocromo P450. La clasificación de estos inductores se basa en el citocromo que incrementan (Okey,1990). Así, los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el 3-metilcolantreno y el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) inducen P450 1A (en la Figura I-22 se recogen los distintos pasos de este proceso); mientras que el Pb, glucocorticoides, etanol y clofibrato aumentan los niveles de los P450 2B,3A,2E y 4A respectivamente; pero también hay ejemplos conocidos donde un agente simple como el hexaclorobenceno, induce dos o más citocromos (Gutkina y Mishim,1986), y donde varios compuestos inducen al mismo citocromo.

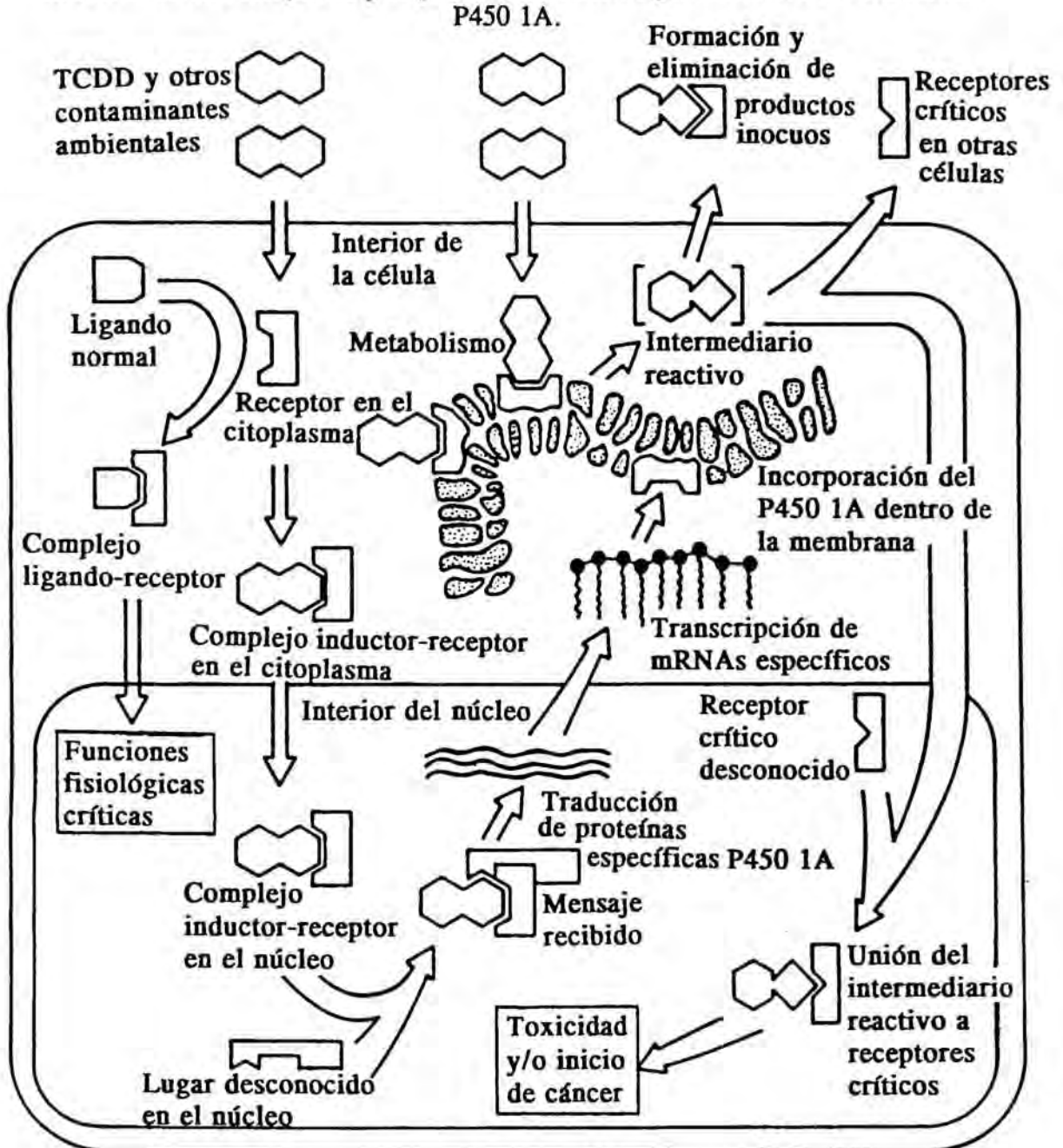
El mecanismo regulador de la expresión del P450 más común consiste en la modificación de la actividad transcripcional, pero no es el único (Coon y col.1992).

La regulación se ha estudiado extensamente en mamíferos; se han descrito los mecanismos transcripcional y diversos postranscripcionales para el control de la expresión del P450 2E1 (isoenzima microsomal hepático del citocromo P450, inducible por etanol en mamíferos) (Nebert y Gonzalez,1987). El gen 2E1 es activado por la transcripción en el recién nacido, y en el adulto se activa bajo ciertas condiciones como la hipoglucemia ya que se incrementan los niveles del correspondiente mRNA (Porter y Coon,1991). Sin embargo, la administración de compuestos como etanol, acetona e imidazol inducen proteínas 2E1 sin afectar los niveles de mRNA, lo que puede ser debido a que el enzima ligado esté protegido de la fosforilación y degradación (Eliasson y col,1990; Tierney y col,1990). La importancia del P450 2E1 se debe a su papel en el metabolismo del etanol, carcinógenos y drogas (Koop, 1992). Otros puntos de regulación menos frecuentes se dan a nivel de procesamiento y transporte del mRNA. En la Tabla I-3 pueden verse los mecanismos de inducción de varios inductores prototipo.

INTRODUCCION

FIGURA I-22

Diagrama de la actividad enzimática (AHH) del citocromo P450 1A sobre el contaminante ambiental TCDD. Esta sustancia se une fuertemente a un receptor del citoplasma impidiendo funciones fisiológicas imprescindibles; de ahí la extrema toxicidad de este compuesto y su posible metabolismo por inducción del citocromo P450 1A.



AHH = arilhidrocarburo (benzo[a]pireno) hidroxilasa.

TCDD = 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina.

INTRODUCCION

Se sabe que el grupo hemo regula los niveles de varias hemoproteínas y enzimas del metabolismo hemo (Ades,1990), y podría jugar un papel regulador en la expresión de uno o más genes del citocromo P450. Se han propuesto como hipótesis para intervenir en la regulación de la inducción transcripcional de los citocromos P450 2B por Pb "pools" de hemo en el núcleo. Como pruebas a favor de esta propuesta están unos resultados en que la inducción de 2B mRNA y la 2B transcripción por Pb puede ser bloqueada por la biosíntesis de inhibidores del hemo (Dwarki y col,1987). La principal conclusión de estos estudios es que el hemo no es un regulador crucial de la transcripción de citocromo P450 inducible por Pb, pero debe tenerse en cuenta.

Se cree que la regulación de los genes del citocromo P450 probablemente esté separada en grupos de mecanismos que afectan genes individuales y controlan la expresión de tejidos específicos (Guengerich,1992a).

La investigación de los mecanismos subyacentes a la respuesta inductiva del P450 por administración de compuestos xenobióticos tiene un valor considerable para entender el papel del citocromo P450 en la potenciación de la toxicidad celular y la carcinogénesis causadas por estas sustancias. Actualmente se intentan discernir los mecanismos moleculares implicados en la regulación fisiológica de la expresión del P450 (Coon y col,1992).

Aunque se conoce mucho sobre los mecanismos moleculares por los cuales el 3-metilcolantreno y los hidrocarburos aromáticos policíclicos relacionados inducen la expresión en el hígado de genes P450 concretos (Whitlock,1990; Okey,1990), los mecanismos (o mecanismo) por los que el Pb y otros inductores químicos tipo Pb aumentan la expresión de los P450 inducibles por Pb son todavía escasamente comprendidos. Se han postulado varios mecanismos por los cuales el Pb y los "inductores como Pb" activan la transcripción de los genes (Figuras I-24, I-25). Podemos resumirlos en tres grupos:

1) Mecanismos de inducción dependientes de receptor: Los receptores del Pb podrían ser en principio proteínas de la membrana plasmática que unen al Pb desde el espacio extracelular en un proceso que conduce a la formación de mensajeros secundarios intracelulares; éstos podrían activar la expresión de los genes 2B (ver Figura I-24, Esquema 1:Modelo de receptor extracelular). No obstante, la naturaleza lipófila del Pb y los "inductores como Pb" sugiere como más probable la existencia de un mecanismo basado en un receptor intracelular, quizás análogo a aquel que se utiliza para las hormonas esteroideas. Así, la unión de Pb a una proteína receptora intracelular podría activar una actividad latente del enlace DNA del receptor. Esto podría conducir a la unión del receptor activado a las secuencias reguladoras del DNA dentro de los genes que responden a Pb, un paso que podría estar acoplado a la activación transcripcional de la expresión de los genes clave (ver Figura I-24, Esquema 2). En este esquema más simple, una sola proteína receptora podría proporcionar tanto la especificidad del enlace como la selectividad del gen clave para la inducción Pb. Además, el receptor activado del Pb podría actuar como un factor de transcripción, facilitando directamente transducir su señal a la maquinaria de transcripción.

INTRODUCCION

2) Mecanismos de inducción dependientes del citocromo P450: Debido a que los receptores del Pb viables aún no han sido identificados, se ha pensado en mecanismos independientes de receptor Pb (Figura I-25). Un dato importante a considerar es la facilidad del Pb y los "inductores como Pb" para activar la expresión de esencialmente los mismos genes P450. Un posible lugar de acción de estas sustancias químicas lipófilas es la unión al sustrato del propio citocromo P450. De este modo, se podría proponer como hipótesis de trabajo que la inducción de P450 2B implica, en un primer paso, una interacción del Pb con uno o más P450 expresados constitutivamente, o quizás con el mismo P450 2B, el cual se expresa a bajo pero detectable nivel en hígado de rata no inducido (Christou y col, 1987).

Según este modelo, la inducción de la expresión de los P450 2B podría estar mediada por un sustrato endógeno de los mismos P450 2B; tal vez fuera un esteroide que normalmente está presente en los hepatocitos a muy bajo nivel debido a que es metabolizado por el P450 basal. La unión del Pb a los 2B podría bloquear el metabolismo de la sustancia endógena, con esto incrementaría la concentración más allá del umbral requerido para la activación transcripcional de los CYP2B (Figura I-25, Esquema 1).

TABLA I-3

Mecanismos de inducción del citocromo P450 por varias drogas.

P450	Inductores prototipo	Mecanismo de inducción primario
1A1	Dioxina 3-metilcolantreno	Activación transcripcional por unión a un receptor activado.
1A2	3-metilcolantreno	Estabilización mRNA.
2B1,2B2	Fenobarbital	Activación transcripcional.
2E1	Etanol, Acetona Isoniazida	Estabilización proteica.
3A1	Dexametasona	Activación transcripcional; parece que actúa independientemente del receptor clásico.
3A1	Triacetiloleandomicina	Estabilización proteica.
4A1	Clofibrato	Activación transcripcional; puede estar mediada por un receptor activado.

INTRODUCCION

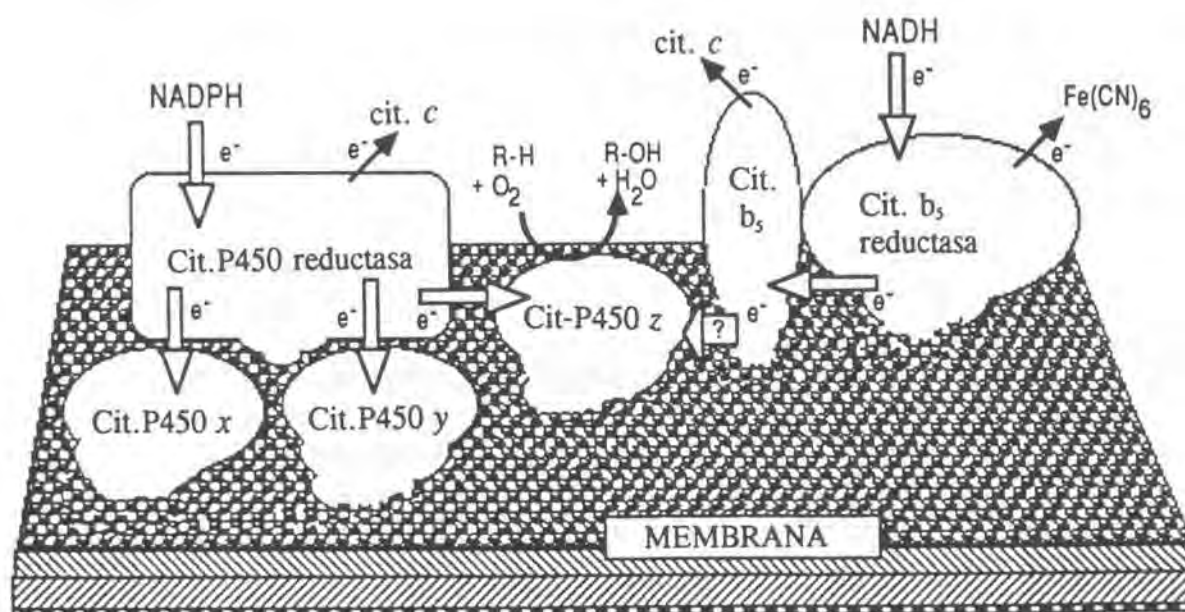
En una formulación alternativa de esta hipótesis cuestionada por Burnet y col.1986, un esteroide endógeno puede servir como "repressor-precursor" que es metabolizado a represor activo por la proteína 2B que se expresa constitutivamente. La unión del Pb a los P450 2B basales podría inhibir la formación del represor activo, conduciendo a la derepresión de la transcripción del *CYP2B* (Figura I-25, Esquema 2).

Tanto si la inducción por Pb se da vía modelo inductor endógeno o vía modelo represor-precursor, hay dos observaciones que sugieren que los P450 2B *per se* no están

FIGURA I-23

Proteínas que componen el sistema enzimático citocromo P450 en la parte del citosol del RE. Los electrones fluyen desde el NADPH citoplasmático a través de la NADPH-citocromo P450 reductasa. En algunos casos el citocromo b_5 , que recibe electrones de la NADH reductasa, puede cederlos al citocromo P450. Hay muchos enzimas citocromo P450 diferentes, aquí se indican como x, y y z.

Algunos de ellos son hidroxilasas específicas ($R-H \rightarrow R-OH$). *In vitro* también pueden aceptar electrones el citocromo c o la ferricianida ($Fe(CN)_6$), tal como se observa en el dibujo.



probablemente implicados de modo directo en el metabolismo de compuestos endógenos relevantes: La primera es la supresión prolongada de las actividades catalíticas de los P450 2B tratados y la segunda se basa en que mantener un alto nivel de activación de los genes 2B debería ser difícil de alcanzar por estos mecanismos.

Un modelo alternativo que podría no estar sujeto a estos dos puntos podría implicar

INTRODUCCION

la inactivación del precursor inductor o del represor endógeno por uno o más citocromos P450 constitutivos cuyas actividades podrían ser inhibidas o moduladas por su interacción directa con Pb u otros "inductores como Pb".

Siguiendo con lo anterior, se deben considerar como candidatos de los inductores endógenos P450 2B aquellos compuestos que son generados como consecuencia directa de la interacción del Pb con uno o más citocromos constitutivos. Por ejemplo, muchos inductores P450 estimulan la oxidación NADPH que no está acoplada a la oxigenación del sustrato pero está unida a la activación no productiva de oxígeno. Esto puede llevar a la formación del anión superóxido, radical OH y otras especies con oxígeno reducido reactivas químicamente, que estimulan la peroxidación de los lípidos. Concebiblemente, estos peróxidos o sus metabolitos secundarios pueden estar implicados en el proceso de inducción directa o indirectamente, ver Figura I-25, Esquema 3.

3) Otros mecanismos de inducción no dependientes de receptor: Además de los efectos específicos descritos arriba, "inductores como Pb" pueden estimular la expresión de P450 2B produciendo cambios generales en la química celular, como son alteraciones en la fluidez de la membrana (como causan los anestésicos), cambios en la presión osmótica (como causan los diuréticos), o cambios en los niveles de receptores en la superficie celular o en los mensajeros secundarios que median la respuesta inductiva (Eckl y col, 1988). Mientras algunos de estos cambios pueden estar relacionados a la hipertrofia del hígado inducida por Pb, otros pueden ser centrales para el mecanismo de inducción del Pb. Por ejemplo, la exposición crónica al Pb conduce a una mayor inhibición del activador de la translocación de la proteinquinasa C desde el citosol a la membrana plasmática (Brockenbrough y col, 1991). El Pb puede también inhibir la proteinquinasa C desplazando al activador de la misma desde su lugar de unión (Chauhan y Brockerhoff, 1987).

Según esto, la inhibición de la proteinquinasa C puede ser un primer paso en el proceso de inducción por Pb. Estos efectos sobre la proteinquinasa pueden muy bien influir en la regulación de los P450 2B o en sus actividades, pero sin contribuir a su inducción por Pb.

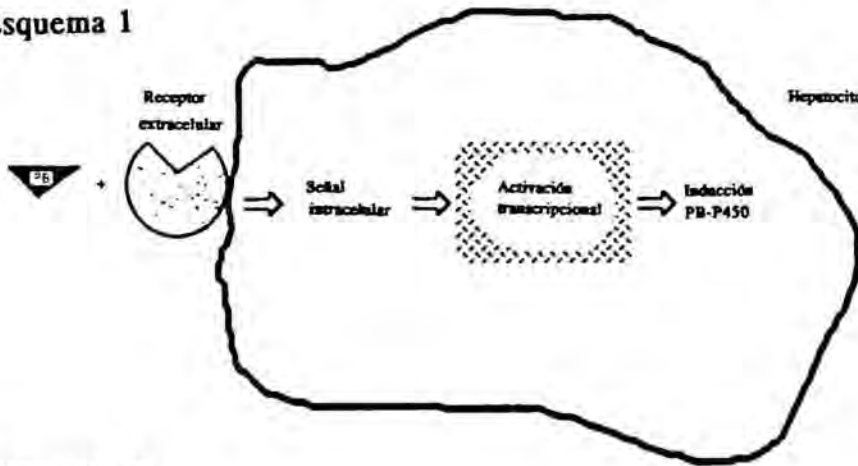
Podemos concluir diciendo que actualmente estos mecanismos sólo empiezan a comprenderse, y futuras directrices en este campo de investigación apuntan a conocer si la inducción por Pb implica un receptor proteico distinto del propio citocromo P450.

Por otra parte, también hay sustancias que inactivan al citocromo P450; así, por citar varios ejemplos, un radical reactivo puede inducir la peroxidación de los lípidos y desnaturalizar al enzima, algunas sustancias pueden formar complejos inactivos con el Fe del citocromo (Franklin, 1977) y un metabolito reactivo puede unirse covalentemente a la apoproteína (Fouin-Fortunet y col, 1986). Concretamente, la actinomicina D y la cicloheximida bloquean la inducción de P450 en cultivos celulares (Nebert y Gelboin, 1970).

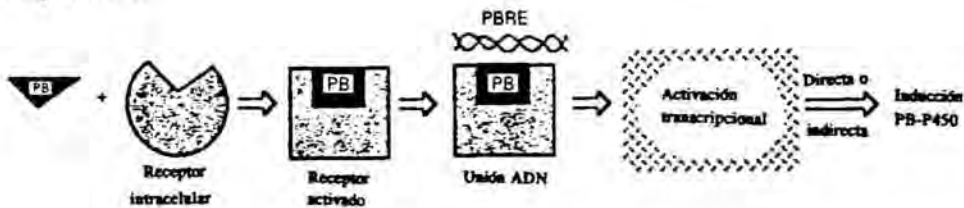
FIGURA I-24

Mecanismos de inducción del citocromo P450 dependientes de receptor.

Esquema 1



Esquema 2



Esquema 1: Modelo de receptor extracelular.

Esquema 2: Modelo de receptor intracelular.

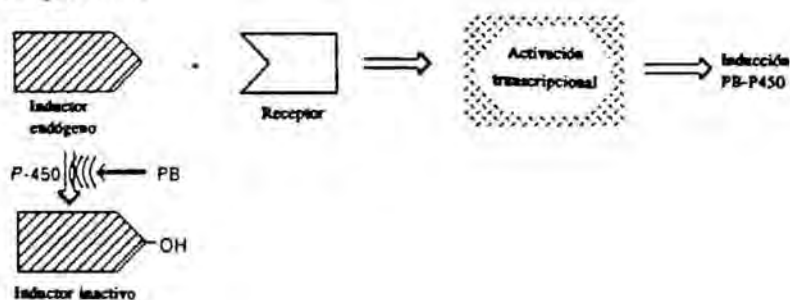
H) Sistema citocromo P450 en las plantas. Funciones.

Aunque existe mucha información sobre reacciones catalizadas por monooxigenasas en las plantas estos estudios se han venido realizando principalmente en animales y microorganismos debido por una parte a los bajos niveles de P450 que existen en las plantas lo cual dificulta su caracterización, y por otra a la inexistencia de anticuerpos dirigidos contra monooxigenasas dependientes del citocromo P450 vegetal; sin embargo en décadas anteriores se estableció con certeza la presencia de citocromo P450 microsomal y mitocondrial en plantas superiores. En animales, la existencia de múltiples citocromos P450 está bien establecida desde hace años (Guengerich y col, 1982). En plantas, la multiplicidad del citocromo P450 se está también haciendo obvia (Kochs y Grisebach, 1989; Gabriac y col, 1991; Donaldson y Luster, 1991); sin embargo, se conoce menos sobre el número de

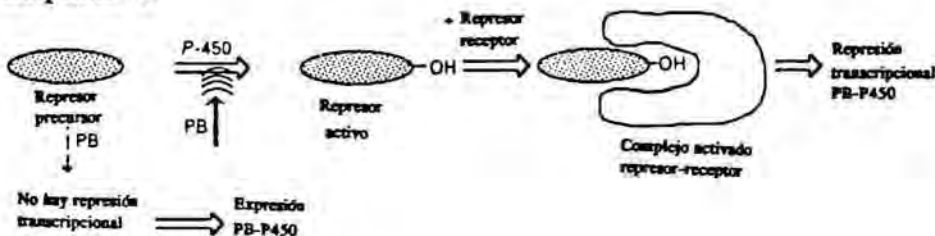
FIGURA I-25

Mecanismos de inducción dependientes del citocromo P450.

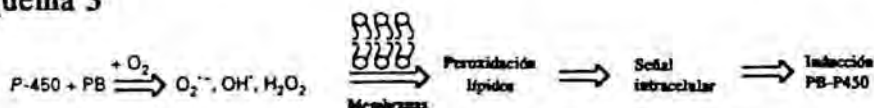
Esquema 1



Esquema 2



Esquema 3



Esquema 1: Inducción mediante inductor endógeno.

Esquema 2: Inducción mediante represor-precursor.

Esquema 3: Inducción mediante interacción directa PB-cit.P450 para dar especies oxigenadas reactivas químicamente que estarían implicadas directa o indirectamente en el proceso de inducción.

isoenzimas del citocromo P450 y sobre el mecanismo de control de sus genes en los tejidos vegetales.

Los citocromos P450 de las plantas parecen similares a los de los animales, también poseen las características principales : dependencia de dioxígeno y NADPH (preferido al NADH, Benveniste y col, 1989) y una banda de absorción a 450nm en su forma reducida y formando un complejo con CO (Rich y Bendall, 1975; Rich y col, 1975). El mínimo sistema para expresar la actividad oxigenasa está compuesto por dos proteínas: una hemoproteína (P450) y una flavoproteína (NADPH citocromo P450 reductasa). La separación de estas dos

INTRODUCCION

proteínas da como resultado una pérdida completa de actividad. El complejo multienzimático se localiza en el RE y enzimas mitocondriales parecidos a las hidroxilasas de los esteroides de mamíferos no se han detectado en las plantas.

Las reacciones llevadas a cabo por algunos citocromos P450 de plantas que han sido ampliamente estudiados parecen indicar una mayor cantidad de mecanismos bioquímicos de reacción que en los animales, obteniéndose no sólo ejemplos de un sistema monooxigenasa P450-reductasa dependiente de NADPH y O₂, sino también de sistemas que son independientes de proteínas transferidoras de electrones (Benveniste y col,1986; Gabriac y col,1991; O'keefe y col,1992; Lau y col,1993) (Figura I-26).

Estos citocromos son muy sensibles a factores ambientales (luz, nutrientes, heridas, etc.) (Benveniste y col,1977,1978; Hagmann y col,1984; Lesot y col,1990). Alani y col. (1990) observaron un aumento de las actividades redox en la membrana glioxisomal y en el retículo endoplasmático durante la germinación de semillas de *Ricinus communis* L. Este hecho se explica porque al germinar una semilla el citocromo P450 interviene en el metabolismo del polipropenil y de los terpenoides y en la síntesis de esteroides y giberelinas (West,1980).

Bozak y col.(1990) determinaron el gen que codifica un citocromo P450 en aguacate (*Persea americana*); ya anteriormente O'keefe y Leto (1989) habían purificado este citocromo (una desmetilasa) y más tarde con estos estudios sobre el citocromo P450 de aguacate, designado formalmente como CYP71A1, observaron una relación entre la aparición de este citocromo durante la maduración del fruto y un aumento en la actividad desmetilasa (O'keefe y col,1992); posteriormente Hallahan y col.(1992) han sugerido que su función puede ser la de una monoterpene hidroxilasa; Werck-Reichhart y col.(1990) encontraron dos isoformas del citocromo P450 que catalizan la O-desetilación en las plantas superiores.

Además, en cultivos celulares de *Catharanthus roseus* se ha purificado un P450 que cataliza la hidroxilación del geraniol (Meijer y col,1990) y, recientemente, Vetter y col.(1992) han caracterizado dos proteínas P450, de Pm aproximado 56kDa, también en cultivos celulares de *Catharanthus roseus*, que inducen a la producción de alcaloides indólicos; una de ellas parece tener mucha relación con la hidroxilasa de Meijer (1990). Otros trabajos han llevado a la purificación de un citocromo P450 en microsomas de soja (*Glycine max*) con un Pm alrededor de 55kDa (Kochs y Grisebach,1989); Higashi y col. (1985) aislaron un citocromo P450 de 52,5kDa de la fracción microsomal de bulbos de tulipán (*Tulipa gesneriana*), y Gabriac y col.(1991) han purificado la ácido cinámico 4-hidroxilasa, un citocromo P450 con un Pm de 57kDa, a partir de microsomas de tubérculos de alcachofa (*Helianthus tuberosus*) inducidos por Mn (ver Tabla I-2). También Zimmerlin y Durst han estudiado la actividad de un enzima del citocromo P450 en el trigo que actúa hidroxilando un herbicida, dicho enzima constituye probablemente el principal factor de resistencia del trigo contra el herbicida. Trabajos similares han demostrado que monooxigenasas microsomales vegetales dependientes del citocromo P450 actúan sobre los herbicidas neutralizando sus acciones tóxicas para la planta (Fonné,1985; McFadden y col,1989; Mougin y col,1990).

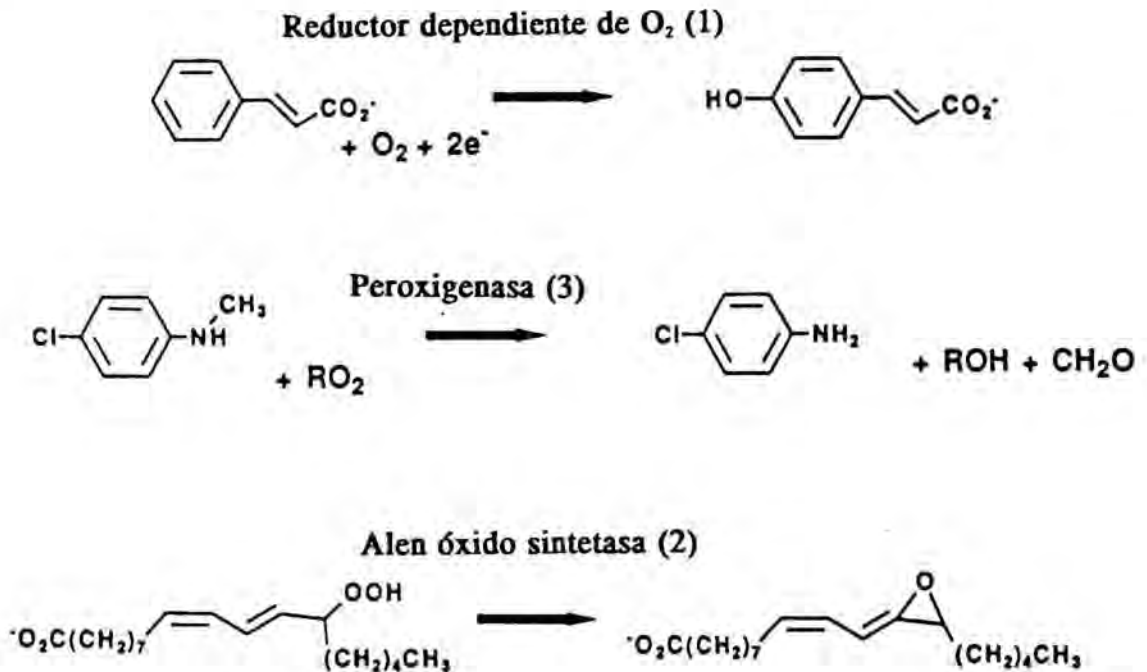
INTRODUCCION

Se ha estudiado el mecanismo de acción de tres isoformas de P450 que oxidan al ácido láurico en las plantas, y que nunca coexisten en la misma planta: la IC-LAH (que hidroxila los C-8, C-9 y C-10 de la cadena del ácido láurico y se encuentra en la mayoría de las plantas; la (w-1)-LAH (propia de gramíneas, hidroxila los C-10 y C-11) y la w-LAH que hidroxila el C-12 y es exclusiva de leguminosas. Ver Figura I-27. Esto implica diferentes configuraciones con lugares activos y diferentes actividades del grupo ferriloxo (Durst y col, 1992). Estos mismos autores han observado que el origen de la estereoquímica de las reacciones depende de la posición del sustrato y no del mecanismo de transferencia del oxígeno *per se*.

Las reductasas vegetales difieren de las de procedencia animal en el peso molecular, que es superior en los enzimas vegetales (82 kDa para la reductasa microsomal de plántulas

FIGURA I-26

Ejemplos de reacciones catalizadas por el citocromo P450 en las plantas, se muestran diversas alternativas para el aporte de oxígeno.



(1) = t-cinamato-4-hidroxilasa.

(3) = pCMA- desmetilasa.

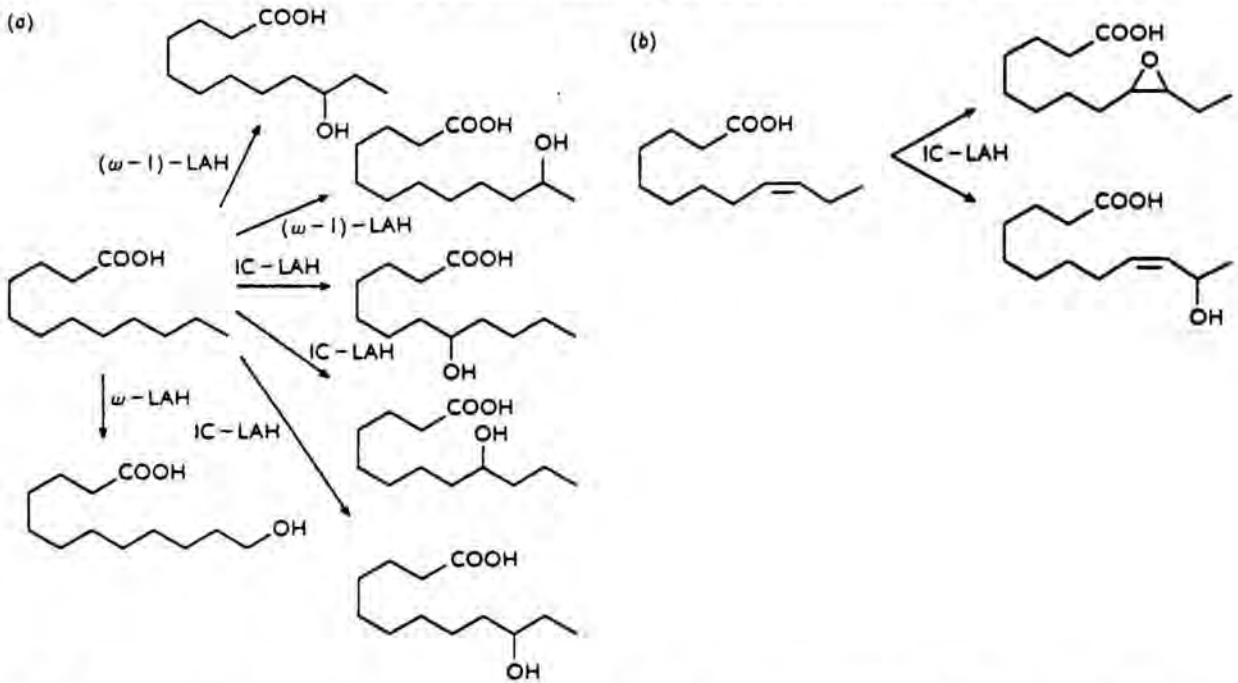
(2) = 13-hidroperoxilinoato: alen óxido sintetasa.

pCMA = p-cloro-N-metilánilina.

INTRODUCCION

FIGURA I-27

Oxidación regioselectiva del ácido láurico por hidroxilasas de las plantas.



a) Regioselectividad del (w)-LAH (ácido láurico w-hidroxilasa) de *Vicia sativa*; del (w-1)-LAH (ácido láurico (w-1)-hidroxilasa) de trigo y del IC-LAH de alcachofa.

b) Reacciones catalizadas por IC-LAH en análogos del ácido láurico insaturado.

de *Vigna radiata*, según Shet y Estabrook,1992). También hay diferencias en el comportamiento cromatográfico, en la labilidad de los grupos prostéticos flavínicos y en el efecto de la concentración salina sobre la actividad catalítica (Benveniste y col,1986). Además, se han comprobado diferencias estructurales entre las reductasas de animales y plantas (Benveniste y col,1982a; Benveniste y col,1989). La inhibición de la NADPH citocromo P450 reductasa inhibe las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 en vegetales (Benveniste y col,1977).

En sistemas animales, se admite que una única NADPH citocromo P450 reductasa está involucrada en oxidaciones microsomales dependientes de citocromo P450, en la desaturación y elongación de los ácidos grasos, en la oxigenación hemo y en la epoxidación del escualeno (Porter y col,1990). En las plantas, sin embargo, se ha puesto en evidencia la existencia de numerosas isoformas de la reductasa microsomal en varias plantas, así, Benveniste y col. (1991) han descubierto tres formas de esta reductasa en microsomas de tubérculos de *Helianthus tuberosus*. Las tres proteínas (80, 82 y 84 kDa) fueron purificadas y caracterizadas como NADPH citocromo P450 (c) reductasas, y las tres son capaces de inducir o estimular la actividad del citocromo P450 purificado a partir de diferentes plantas; también se han

INTRODUCCION

detectado tres isoformas, con pesos moleculares entre 80 y 84 kDa, en embriones de maíz, cultivos de células en suspensión de *Catharanthus* y plántulas de *Vicia sativa*; y otras dos en tubérculos de patata dañados, en aguacate y en células en suspensión de *Veronica* y trigo (ver Tabla I-2).

Una 12 β -hidroxilasa que cataliza la hidroxilación de digitoxina y otros cardenólidos de la serie A a digoxina y los correspondientes cardenólidos de la serie C fué aislada de cultivos de células en suspensión de *Digitalis lanata*. El enzima se localiza en la fracción microsomal y necesita O₂ y NADPH₂. La inhibición de la hidroxilación por CO y la reversibilidad de esta inhibición con luz de 450nm, así como la estimulación de la reacción por KCN sugiere la intervención del citocromo P450, el cual está presente en las células de *Digitalis* (Petersen y Seitz,1985).

La actividad de las monooxigenasas vegetales depende, como ya hemos mencionado, de la NADPH citocromo P450 (c) reductasa, igual que en los animales, que proporciona los electrones necesarios para activar el oxígeno en el centro hémico del citocromo. Estudios realizados por Lesot y col.(1990) indican que estas actividades son fuertemente incrementadas por la edad y las heridas en tubérculos de *Helianthus tuberosus*.

Es un fenómeno conocido la interacción catalítica que se da entre NADPH citocromo P450 reductasa y citocromo P450 de procedencias diferentes. De este modo, además de otros ejemplos entre animales distintos, la reductasa procedente de microsomas hepáticos de conejo reconstituye la actividad cinamato hidroxilasa con el citocromo P450 de alcachofa (Benveniste y col,1991) y la reductasa de hígado de rata interacciona con el citocromo P450 de aguacate (*Persea americana*) para dar la actividad desmetilasa (O'keefe y Leto,1989).

Los citocromo P450 monooxigenasas de plantas superiores están involucrados en caminos biosintéticos importantes :

- * Producción de ligninas y flavonoides (Grand,1984).
- * Hidroxilación de ácidos grasos (Salaün y col,1978; Benveniste y col,1982b).
- * Síntesis de cutinas y suberinas (Soliday y Kolattukudy,1977; Kolattukudy,1980; Durst y col,1992).
- * Síntesis de hormonas terpénicas (Hasson y West,1976).
- * Síntesis de alcaloides (Madyastha y col,1976).
- * Producción de fitoalexinas (Fujita y col,1982; Kochs y Grisebach,1986).
- * Hidroxilación de moléculas esteroídicas como los cardenólidos (Petersen y col,1987).
- * Destoxificación de herbicidas.

También está implicado en el metabolismo de compuestos lipófilos en los tejidos vegetales (Frear y col,1969). Es de destacar que actúa en la destoxificación de herbicidas (West,1980).

CITOCROMO P450_{scc}

La rotura de la cadena lateral del colesterol es una de las reacciones más estudiadas de las que se producen en la mitocondria debido principalmente a que constituye un paso limitante en la biosíntesis de hormonas esteroideas en animales; también es uno de los principales pasos limitantes en la biosíntesis de cardenólidos; en esta reacción interviene el sistema enzimático dependiente del citocromo P450 (P450_{scc}), producto del gen *CYP11A* (Nebert y col,1991).

Las formas mitocondriales del citocromo P450 están codificadas por genes nucleares, sintetizadas en los ribosomas del citoplasma como precursores y transportadas dentro de la mitocondria de forma postraducciona. Las formas precursoras son mayores que sus correspondientes formas maduras que se encuentran en la mitocondria, aquellas poseen porciones de péptido con el aminoácido terminal de las formas maduras. La porción de los péptidos tiene unas dimensiones desde 24 aminoácidos para P45011b (P4509B1) hasta 39 aminoácidos para el P450_{scc} (P4509A1). Estudios realizados en animales localizan el citocromo P450_{scc} en el lado de la matriz de la membrana interna de la mitocondria (Hanukoglu y col,1990).

Una vez que han penetrado los precursores dentro de la mitocondria, los péptidos se rompen en las porciones madurando por una proteasa en el compartimento de la matriz, y las proteínas maduras se incorporan en la membrana interna. El mecanismo de integración de las moléculas de P450 maduras dentro de la membrana, aún no está claro. Por otra parte, se sabe que formas microsomales de P450 se incorporan dentro de la membrana cotraduccionalmente en la porción de superficie rugosa del retículo endoplasmático, sin que haya ningún proceso proteolítico de moléculas sintetizadas nuevamente.

Existen porciones de péptidos que dirigen la entrada de las proteínas precursoras dentro de la mitocondria, y la información necesaria para este hecho parece estar contenida en su porción terminal de 15-20 residuos de aminoácido. Los aminoácidos básicos en esta porción de péptidos parecen esenciales para la entrada de precursores. Cuando esta porción particular se elimina o cambia, la proteína precursora modificada no penetra dentro de la mitocondria (Kumamoto y col,1987).

Los precursores de los citocromos P450 mitocondriales sintetizados *in vitro* entran en la mitocondria aislada; se procesan correctamente y las formas maduras se incorporan en la membrana interna. El proceso de penetración depende del potencial de membrana de la mitocondria y también de los factores proteicos del citosol. La pérdida energética de la mitocondria debido a desacopladores inhibe la entrada de precursores proteicos.

El sistema de penetración *in vitro* parece reproducir el que se da en las células, pero este último es aparentemente mucho más eficaz que el primero. En las células no se acumulan cantidades detectables de proteínas precursoras, mientras que la entrada de algunos precursores *in vitro* es incompleta (Omura e Ito,1991). El procesamiento de los precursores que han penetrado se lleva hasta su forma madura catalizado por una proteasa(s) en la

INTRODUCCION

mitocondria; la reacción normalmente es rápida. Se han purificado una serie de proteasas solubles a partir de mitocondrias de hígado de rata, que procesan los precursores del P450_{scc} a sus formas maduras (Ou y col, 1989). La transferencia de electrones desde el NADPH hasta el citocromo P450_{scc} está mediatizada por una flavoproteína que contiene FAD (la NADPH citocromo P450_{scc} reductasa) y sigue el mecanismo de las cadenas de transporte de electrones mitocondriales que hemos visto en el apartado anterior.

El citocromo P450_{scc} se une al sustrato, en este caso el colesterol, y la rotura de la cadena lateral está catalizada por una monooxigenasa de acción mixta que se encuentra en la mitocondria e implica tres pasos consecutivos de monooxigenación con la transferencia de seis electrones en total para la formación de una molécula de pregnenolona (Jefcoate, 1986) (ver apartado I.4.4. en esquema biosíntesis). El mecanismo de acción del P450 para estas reacciones de hidroxilación puede verse en la Figura I-5 del apartado anterior. La afinidad del citocromo P450_{scc} para los hidroxicoles teroles intermediarios es muy superior a la que tiene para el colesterol (Orme-Johnson y col, 1979).

Algunos autores, estudiando la reacción de hidroxilación del (20R)20-hidroperoxi-colesterol catalizada por el citocromo P450_{scc} adrenal, y basándose en las propiedades paramagnéticas de los electrones (EPR) han propuesto como intermediario transitorio en la rotura del enlace dioxígeno (O-O) a una porfirina con un radical catiónico π Fe⁴⁺ (Larroque y col, 1990). Aunque en la biosíntesis de cardenólidos las dos hidroxilaciones del colesterol, antes de formar pregnenolona, conducen a (20R,22R)20,22-dihidroxicolesterol, y no a (20R,21R)20,21-dihidroxicolesterol como ocurre en el citado estudio; el intermediario propuesto puede aclarar bastante este tipo de reacciones.

En estos últimos años, el citocromo P450_{scc} mitocondrial bovino ha sido expresado en *Escherichia coli* por primera vez como una proteína espectrofotométrica y catalíticamente activa (Wada y col, 1991).

La alta insolubilidad del colesterol en agua implica que detergentes o bien fosfolípidos sean necesarios para favorecer el acceso del colesterol al citocromo (Sligar y Murray, 1986), y la actividad del sistema responsable de esta rotura depende en gran parte de la naturaleza del fosfolípido utilizado (Lambeth y col, 1980).

Se sabe que en el caso concreto de la rotura de la cadena lateral del colesterol la velocidad de reacción depende de la transferencia de colesterol desde la membrana interna de la mitocondria al lugar de unión del sustrato con el citocromo P450_{scc} (Kazuhiko y col, 1991). Debemos considerar además que el NADPH no penetra libremente dentro de la mitocondria intacta y como consecuencia, la actividad de las colesterol esteroide hidroxilasas depende de la formación de NADPH en la mitocondria (Jefcoate, 1986). Por otra parte existe una reducción del oxígeno molecular debida al funcionamiento de la cadena respiratoria en la mitocondria, y esto hace que disminuya la disponibilidad de esta molécula para los citocromos P450 responsables de la síntesis de esteroides; Stevens y col. (1984) observaron que la actividad del P450_{scc} esta limitada por la deflexión de oxígeno.

4.6. PRODUCCION DE CARDENOLIDOS

4.6.1. *IN VIVO*.

NIVELES DE CARDENOLIDOS EN LOS DISTINTOS ORGANOS DE *DIGITALIS PURPUREA*

La composición y niveles de cardenólidos en los tejidos de *Digitalis purpurea* varían durante la germinación y también con la edad de la planta o la unidad morfológica examinada.

Las semillas de *Digitalis purpurea* contienen gran cantidad de cardenólidos que van disminuyendo lentamente a lo largo del período de germinación (aproximadamente 15 días) desde un valor de 200 μ g a 42 μ g/gPF; después se observa un rápido incremento que coincide con el desarrollo de las primeras hojas verdaderas. Este cambio gradual del contenido en cardenólidos indica que estos compuestos no son metabólicamente inertes y su síntesis empieza cuando se forman los pigmentos verdes en las hojas (Figura I-28).

En todas las etapas de la germinación el cardenólido predominante es la digitoxigenina, aumentando rápidamente su producción durante los diez primeros días, para disminuir a continuación mientras se incrementa la proporción de gitoxigenina (Evans y Cowley, 1972a).

En plantas de *Digitalis purpurea* las concentraciones más altas de cardenólidos se obtienen durante el primer año, alcanzando un máximo a los 6-7 meses después de la germinación (115,6 μ g/gPF), coincidiendo con un período de rápido crecimiento para la planta; en los tres meses siguientes hay poco crecimiento y los cardenólidos disminuyen hasta 11 μ g/gPF en el onceavo mes, volviendo a aumentar ligeramente cuando empiezan a formarse las yemas aéreas (aprox. cuando las plantas tienen un año) (Figura I-29).

Durante el segundo año la edad de las hojas tiene un gran efecto sobre la cantidad de cardenólidos. Se han aislado concentraciones de 130 μ g/gPF a partir de hojas jóvenes del ápice del tallo, siendo éstas muy similares a los altos niveles detectados en las hojas de 6-7 meses de edad de plantas del primer año. Las hojas de la roseta basal de plantas del segundo año, contienen menos de la mitad de cardenólidos que las hojas jóvenes (51 μ g/gPF).

Las concentraciones en tallo y raíces son relativamente bajas, 30 μ g/gPF y 20 μ g/gPF respectivamente; en cambio se hallan grandes cantidades durante todo el desarrollo de la inflorescencia (99 μ g/gPF en las yemas florales y 108 μ g/gPF en las flores maduras). En los frutos las concentraciones aumentan desde 75 μ g/gPF en frutos inmaduros hasta 480 μ g/gPF en los frutos madurados totalmente.

Por tanto, los cardenólidos se distribuyen generalmente por todas las partes de la planta en el segundo año; en los órganos jóvenes como yemas florales, frutos verdes y hojas

INTRODUCCION

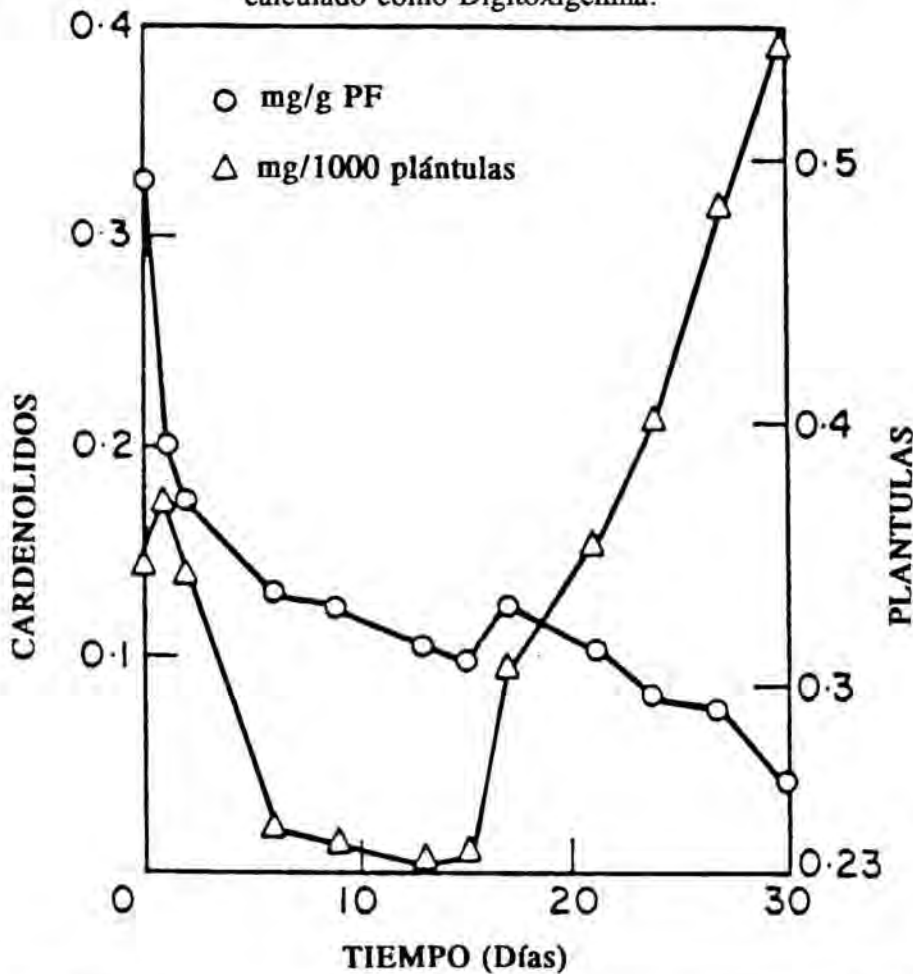
jóvenes, se encuentran concentraciones elevadas pero las más altas se dan en los frutos totalmente maduros (Evans y Cowley, 1972b).

Se sabe que tanto cardenólidos como sapogeninas esteroídicas, ambos presentes en *Digitalis purpurea* como se vio anteriormente, derivan de los fitosteroles; y aunque los dos grupos de compuestos se encuentran juntos en los diversos órganos de la planta, aquellos órganos más ricos en uno de los dos son deficitarios en el otro y viceversa. Las fases de crecimiento influyen en la ruta del metabolismo del colesterol hacia la biosíntesis de cardenólidos o de sapogeninas esteroídicas; no ocurre lo mismo sin embargo durante el período de germinación de las semillas, donde parece que no hay conexión entre estos dos caminos bioquímicos divergentes (Evans y Cowley, 1972b).

La mutua interconversión de cardenólidos fué demostrada por Weiler (1979) en plantas de *Digitalis lanata* y se apuntó el cambio gradual en la composición de glucósidos

FIGURA I-28

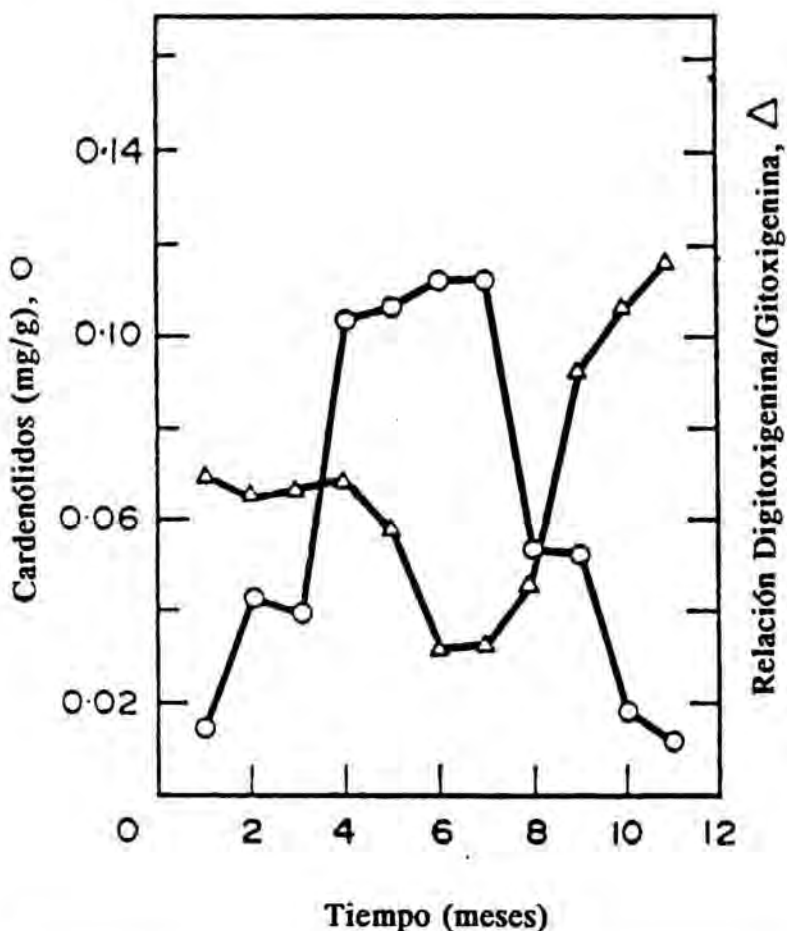
Variación del contenido en cardenólidos durante la germinación, calculado como Digitoxigenina.



INTRODUCCION

FIGURA I-29

Variación de los niveles de cardenólidos durante el primer año de crecimiento. Los cardenólidos están calculados como Gitoxigenina.



cardiotónicos durante el primer período de vegetativo, además estas variaciones no están sólo relacionadas con los estados de desarrollo de la hoja sino también con los factores externos.

Recientemente, en un estudio realizado por Groeneveld y col. (1992) con plantas de *Digitalis lanata* se ha observado una composición de cardenólidos más estable en las plantas crecidas en cultivo hidropónico, y por tanto más controladas, que en aquellas crecidas en tierra en el invernadero a temperatura constante; en ambos casos se recolectaban hojas jóvenes, de una edad determinada, para el análisis.

INTRODUCCION

Se sabe que el contenido en glucósidos cardiotónicos es máximo (0,38%) en suelos ricos en materia orgánica, seguidos por los suelos arenosos (0,35%) y los suelos arcillosos (Imtiaz-ul-Haq,1991).

En la Tabla I-4 se recogen los contenidos en cardenólidos hallados por varios autores en especies de *Digitalis in vivo* .

TABLA I-4

Producción de cardenólidos *in vivo* de diferentes especies de *Digitalis*.

<u>Especies</u>	<u>Material cultivado</u>	<u>Cardenólidos</u> ($\mu\text{g/gPS}$)	<u>Referencias</u>
<i>Digitalis purpurea</i>	Hojas	1.600 (digitoxina) 1.440 (gitoxina)	Khafagy (1974)
<i>Digitalis lanata</i>	Hojas maduras (mesófilo)	> 30.000	Weiler y Zenk (1976)
<i>Digitalis purpurea</i>	Hojas	820 (digitoxina) 1.453 (gitoxina)	Fujii (1983)
<u>en otras unidades</u> (espresados como digitoxina)			
<i>Digitalis thapsi</i>	Plántulas(Hojas) (Raíces)	14,02 $\mu\text{g/gPF}$ 3,87 $\mu\text{g/gPF}$	Corchete y col. (1990)
<i>Digitalis lanata</i>	Hojas jóvenes	1,62-2 $\mu\text{mol/gPF}$	Groeneveld y col. (1992)

4.6.2. *IN VITRO*

4.6.2.1. CULTIVOS *IN VITRO*

Características

La producción de compuestos del metabolismo secundario mediante el cultivo vegetal *in vitro* constituye una parte importante de la Biotecnología vegetal. Por numerosas razones (producción independiente de los problemas geográficos, climáticos y políticos; posibilidad de optimizar las condiciones de crecimiento, lograr una mejor calidad y recuperar el producto más fácilmente, etc.) el cultivo de callo, de células en suspensión, de células inmovilizadas y de raíces transformadas, ofrece o puede ofrecer un procedimiento alternativo al cultivo en gran escala de la planta, para la producción comercial de metabolitos secundarios importantes.

La producción de cardenólidos requiere costes muy elevados y un comercio de gran embergadura si se utiliza el cultivo tradicional, además, no pueden ser producidos por microorganismos ni económicamente por síntesis química, de ahí que se estén ensayando las técnicas del cultivo *in vitro* para que permitan, además de solucionar lo anterior, una mejora en la producción y una mayor uniformidad en el contenido de estos principios activos.

En el plano de la investigación básica, los cultivos *in vitro* capaces de la producción de los compuestos secundarios deseados, al permitir experimentos inaccesibles a nivel de la planta intacta, son teóricamente el medio ideal para el estudio de las rutas biosintéticas que conducen a la formación de metabolitos secundarios. Estos cultivos constituyen, además, una excelente fuente de sistemas enzimáticos.

A pesar de que se han logrado éxitos en la obtención de varios metabolitos secundarios como diosgenina, ginsenósidos, etc. no ha ocurrido igual en todos los cultivos ya que con frecuencia se observa que los cultivos *in vitro*, ya sean de tejido de callo o celulares, poseen escasa capacidad para la producción de metabolitos secundarios, aunque su información genética se encuentre intacta. En los cultivos de *Digitalis purpurea* se hace patente este fenómeno puesto que ni los cultivos de callo ni los de células en suspensión o inmovilizadas, han logrado mejorar, ni tan solo igualar los niveles de cardenólidos producidos por la planta intacta. Sin embargo, parece ser que la capacidad de síntesis más que perderse, se inhibe, ya que las plantas regeneradas a partir de los cultivos de tejidos muestran el mismo espectro de cardenólidos que las plantas intactas, y esto ocurre tanto en plantas regeneradas a partir de callos con un contenido relativamente alto de cardenólidos como de los que tienen un bajo contenido (Schöner y Reinhard, 1986). Por lo tanto, se deduce que la información genética no ha variado durante el cultivo (Hirotsu y Furuya, 1977).

Kartnig (1977) encontró que la producción de cardenólidos en los cultivos de tejidos de especies de *Digitalis* disminuía con el tiempo de cultivo; además, a medida que iba repicando sucesivamente los callos, la cantidad de cardenólidos era menor. Obviamente, la capacidad para producir cardenólidos en los cultivos de tejidos es suprimida gradualmente durante el transcurso del cultivo (Hagimori y col, 1980; Gurny y col, 1981; Kartnig y col,

INTRODUCCION

1982; Diettrich y col,1987b; Corchete y col,1990). A la misma conclusión llegamos en nuestro laboratorio trabajando con cultivos de callo de *Digitalis purpurea* (Boada,1988). En estudios posteriores realizados por Kartnig y col.(1983) se comprobó que no sólo bajaba la producción de cardenólidos sino que también disminuía el contenido de todos los demás metabolitos secundarios.

La Tabla I-5 recoge el contenido de cardenólidos en cultivos *in vitro* de varias especies de *Digitalis*, se observan cantidades mucho más pequeñas que en los cultivos *in vivo* (comparar con la Tabla I-4).

Variabilidad genética

La base fundamental del cultivo *in vitro* es la totipotencia celular, pero los estudios que se realizan dan muy diversas respuestas a esta cualidad imprescindible, teóricamente, para el trabajo en cultivos de tejidos y células. El genoma de las células vegetales no es exacto en unas células que en otras y las causas son múltiples.

Muchos ciclos de síntesis de DNA no están acompañados por mitosis, y el resultado es una poliploidía o una politenia. Estas características son comunes en los tejidos vegetales que no están destinados a la división, como los parénquimas del xilema, el periciclo, el procambium, mientras que el cambium permanece diploide. No está claro cual es la significación de la poliploidía, pero Van't Hoff y col.(1986) afirman que la poliploidía puede considerarse esencial para la diferenciación.

En los cultivos *in vitro* las condiciones internas se limitan al mandato genético, ya que exceptuando los cultivos habituales, se añaden fitohormonas al medio de cultivo de manera que pueden considerarse factores externos. Así pues, debemos considerar que los factores externos que envuelven al cultivo *in vitro* son los que modulan la expresión del genoma vegetal (ver sección I.4.5).

En los cultivos de células pueden existir poblaciones muy heterogéneas que posean distintos estados fisiológicos y cada uno puede reaccionar de manera diferente a las condiciones externas, por ello se da, a veces, una acumulación tan variable de principios secundarios. Los explantes de ciertas plantas son capaces de producir alcaloides dando rendimientos parecidos a los de las plantas originales (Bohm,1980). Sin embargo, en algunos cultivos se han encontrado variaciones en la proporción en la que se encuentran los distintos alcaloides. Por ejemplo, en cultivos de *Datura*, la escopolamina se encuentra en muy escasa proporción, mientras que en los extractos de planta es el alcaloide predominante (Corduan, 1975).

También, en experiencias realizadas por Zenk y col.(1977), comparando los espectros alcaloídicos de cultivos derivados de protoplastos de una misma hoja de *Catharantus* se encontró que eran muy distintos. Este hecho demuestra que el estado fisiológico inicial de la célula de la cual deriva el callo juega un papel importante en el desarrollo del cultivo. Los

INTRODUCCION

TABLA I-5

Producción de cardenólidos en diferentes cultivos *in vitro* de *Digitalis*.

Especies	Cultivo	Condiciones	Cardenólidos		Referencias
			(expresados como digitoxina)	($\mu\text{g/gPS}$)	
<i>Digitalis sp.</i>	Suspensión	Callos indiferenciados		0,5-2	Nover y col. (1979)
		Medio sólido	EGV	80-100	
		Medio líquido	Irradiación	100-150	
<i>D. lanata</i>	Medio sólido (anteras)	EGB sin luz		1	Garve y col. (1980)
		EGB con luz		10-50	
		EGV con luz		30-100	
		Embrioides		30-100	
	(tallo)	Plántulas, tallos		80-400	
		EGB sin luz		1	
		EGB con luz		6-24	
		EGV con luz		10-150	
<i>D. purpurea</i>	Medio líquido	CFY.Luz		20-40	Hagimori (1982)
		CI.Luz		0,05-0,2	
<i>D. lanata</i>	Medio líquido (Diferenciación)	Luz		108	Ohlsson (1983)
		Oscuridad		4	
<i>D. lanata</i>	Medio líquido	Embriones.Luz		100	Kuberski (1984)
		Plántulas regeneradas		150	
<i>D. lanata</i>	Medio líquido y sólido	EGV con luz		10	Luckner y Diettrich (1985,1988)
		EGB sin luz		1	
		Vástagos		100-400	
		Embriones adventicios			
		oscuridad		50	
		luz		100-400	
		Embriones sin luz		10	
		Plántulas		150	
<i>D. purpurea</i>		Vástagos		50	
<i>D. lanata</i>	Medio líquido	BA, luz		84,5	Ohlsson (1990)
		BA,oscuridad		4,9	
		BA,luz,ABA		12,4	
		BA,oscuridad,ABA		2,5	
<i>D. thapsi</i>	Medio sólido (callos)	de hojas		1,12	Corchete y col. (1990)
		de raíces		0,11	

INTRODUCCION

factores moleculares que provocan estas condiciones se desconocen y en la actualidad se utiliza el término de variación somaclonal para definirla.

Más curioso es el hecho, de que en los cultivos celulares, pueden encontrarse sustancias que no se dan *in vivo*. El fenómeno de alteración del metabolismo secundario en los cultivos de células, no está restringido a los alcaloides, sino que estos resultados pueden extrapolarse a cualquier otro metabolito.

Estas aparentes anomalías se han atribuido a diversos factores:

1) **La inexistencia de diferenciación en los tejidos de callo o de células en suspensión:** Street en 1973 encontró que los callos de *Atropa* que diferenciaban raíces producían los alcaloides del tropano, mientras que los indiferenciados procedentes del mismo material no poseían esta capacidad. Lo mismo se advirtió en cultivos de tejidos diferenciados de *Papaver bracteatum* y *Nicotiana tabacum*, que tienden a producir más betaína o nicotina respectivamente que los callos indiferenciados (Garve y col, 1980).

2) **El potencial de biosíntesis del cultivo de células derivadas de una parte de una planta:** No se han dado pruebas experimentales de esta hipótesis; sin embargo, se ha observado que todo el potencial genético y fisiológico para la formación de metabolitos secundarios se encuentra en células aisladas sin que intervengan las partes de las plantas de las que se han tomado los explantes.

3) **El rearrreglo estructural de los genomas de las células en cultivo por endoduplicación y /o por fragmentación nuclear:** hechos ampliamente comunes en los cultivos *in vitro*, que pueden conducir a alteraciones significativas en el genotipo de cierta proporción de poblaciones celulares y causan alteraciones en el metabolismo secundario.

Biotecnología

La utilización biotecnológica de los cultivos *in vitro* en las plantas, se caracteriza por dos técnicas posibles, ambas se basan en la capacidad de diferenciación también *in vitro* de las células vegetales:

- 1) Conseguir plantas de calidad y lograr una rápida propagación de las mismas.
- 2) Producir sustancias de interés comercial a partir de la capacidad de biosíntesis y transformación de las células de las plantas.

La formación de callo es inducida sobre explantes de diversos órganos tanto de plántulas como de plantas adultas de distintas edades de varias especies de *Digitalis*. El cultivo del nuevo callo formado produce cepas para el cultivo de tejidos y según el medio y la clase de tejido que se utilicen para el cultivo, los callos se diferencian en el nivel de crecimiento, morfología, color y tendencia a la diferenciación en órganos y probablemente

INTRODUCCION

las diferencias que se observan en los callos son parecidas tanto al principio del cultivo como en los siguientes repicajes. El mantenimiento de los cultivos de tejidos de *Digitalis* se realiza en medio sólido o líquido, por técnicas de cultivos estáticos o sumergidos.

Para obtener cultivos en suspensión, los callos se colocan en medio líquido que se mantiene en movimiento, ya sea en frascos de cultivo en agitadores mecánicos o bien aireando las suspensiones, ambas técnicas son utilizadas para los estudios del metabolismo.

En el caso de los cultivos estáticos, los callos se suspenden en medio líquido sólo durante el tiempo que dura el experimento. En las suspensiones celulares, además de células individuales también aparecen agregados celulares y la relación entre ellos y el tamaño de dichos agregados varía fuertemente según las condiciones ambientales.

La mayoría de conocimientos sobre el comportamiento de las células en suspensión de *Digitalis* se basan en los experimentos realizados con grupos celulares en frascos Erlenmeyer sobre plataformas agitadoras, o en diferentes clases de biorreactores. El interés de estos experimentos no va dirigido solamente al crecimiento sino también a ciertas reacciones celulares.

Hay diferentes tipos de biorreactores: los que poseen agitadores mecánicos y aquellos con técnicas especiales para la aireación; ya que las células de las plantas son muy sensibles a los traumatismos, parecen ser más adecuados los reactores de aire. Una recopilación sobre los diferentes tipos y sus efectos sobre las células de las plantas, comparando el rendimiento en biomasa y la productividad, puede encontrarse en el trabajo de Wagner y Vogelmann (1977).

Una alta producción de protoplastos podía ser obtenida a partir de suspensiones de *Digitalis lanata* y *Digitalis purpurea* (Dietrich y col, 1980, 1982a). Las colonias celulares desarrolladas a partir de protoplastos individuales se cultivan posteriormente y se pueden utilizar para tener líneas de células clonales. Esto posee especial interés en aquellos casos en que resulta dificultoso aislar células individuales.

Se han elaborado algunos métodos para obtener vacuolas aisladas vía preparaciones de protoplastos de *Digitalis lanata*. Estos métodos constituyen otro sistema satisfactorio para ulteriores estudios de biotransformación y biosíntesis de productos secundarios a nivel celular (Pfeiffer y col, 1982; Kreis y Reinhard, 1985b).

Cultivo *in vitro* para la obtención de productos secundarios

Particularidades

Para la obtención de metabolitos secundarios *in vitro* se utilizan, en general, las mismas técnicas que para el cultivo de tejidos o células vegetales, pero existen condiciones particulares para establecer la síntesis de dichas sustancias, ya que, frecuentemente, las

condiciones que llevan a la mayor obtención de biomasa, no son las idóneas para acumular metabolitos secundarios. Muchas veces los cultivos se establecen de la misma manera que los cultivos de tejidos para la obtención de biomasa y después se cambian las condiciones para inducir la síntesis de metabolitos secundarios.

Para mejorar el rendimiento de varios productos se han desarrollado técnicas para seleccionar cultivos celulares de plantas altamente productoras. La base para esta selección es la variación somaclonal dentro de una población de células. Los clones se seleccionan y subcultivan a partir de células simples; no obstante, estos cultivos altamente productores a menudo muestran un declive en la productividad tras una serie de propagaciones, y por esto, se necesitan reselecciones a intervalos regulares.

Otro intento de mejorar el rendimiento de los productos en los cultivos de células vegetales es la alteración del metabolismo celular por factores externos (estrés). Las células de las plantas cultivadas son en principio totipotentes y, por tanto, cualquier producto presente en la planta intacta debería también ser sintetizado en cultivos bajo condiciones de incubación adecuadas. Podrían ser de gran utilidad métodos generales para la inducción de enzimas del metabolismo secundario; es bien conocido que ciertos enzimas de este metabolismo son inducidos en las plantas superiores después de la infección por microorganismos patógenos. La interacción patógeno-huesped, frecuentemente, es específica de la especie, y el producto inducido (fitoalexina) es tóxico para el organismo invasor, además, esta interacción conduce a la inducción de enzimas en las plantas y podría darse también en cultivos celulares. Extractos de paredes celulares o micelas de microorganismos patógenos son efectivos para inducir la síntesis de fitoalexinas en tales sistemas, sin embargo, muchos de los organismos patógenos usados como fuentes para ser elicitores son relativamente difíciles de cultivar a gran escala; por esto serían beneficiosas las preparaciones de elicitores obtenidas en cantidades substanciales y con rapidez, tales preparaciones deberían además ser efectivas con diferentes sistemas celulares de plantas. Funk y col.(1987) hicieron estudios sobre la inducción de enzimas del metabolismo secundario en cultivos en suspensión de células vegetales preparando un elicitore a partir de extractos de levadura.

Biotransformación

El término biotransformación se refiere principalmente a una técnica comercial para estimular las células de modo que alteren químicamente una sustancia dada en otra de acuerdo con una dirección prediseñada. El cultivo *in vitro* abre la posibilidad de utilizar células de plantas para la transformación de esteroides como ya es común en los microorganismos.

Debido a que las células de las plantas metabolizan una serie de compuestos exógenos aplicados, el uso de cultivos celulares puede no sólo ser de gran ayuda para estudiar los caminos biosintéticos, sino también para propósitos comerciales ya que pueden biotransformarse distintas sustancias mediante células de plantas; son particularmente importantes los esteroides (Stohs y Rosenberg,1975; Stohs,1977,1980; Reinhard y Alfermann,1980).

INTRODUCCION

Los métodos de cultivo más utilizados para llevar a cabo la biotransformación de substratos exógenos son el cultivo de raíces, el de células en suspensión y el de células inmovilizadas. Este último ofrece las siguientes ventajas:

- a) Las células resisten a los trastornos físicos por la inmovilización.
 - b) Las células inmovilizadas pueden ser utilizadas repetidamente durante un período de tiempo prolongado.
 - c) Se pueden conseguir altas transformaciones de biomasa, permitiendo, de este modo, la conversión de gran cantidad de substrato.
 - d) El método facilita la recuperación de la masa de células y sus productos.
 - e) Son posibles posteriores tratamientos químicos.
- (Suga e Hirata, 1990).

La reacción tipo, la estereoespecificidad, enantioselectividad, y los mecanismos implicados en las biotransformaciones de los substratos exógenos por cultivos de células de plantas se clasifican según las clases de reacciones químicas del modo siguiente:

- 1) Hidroxilación
- 2) Oxido-reducción entre alcoholes y cetonas.
- 3) Reducción del doble enlace carbono-carbono.
- 4) Conjugación con azúcares.
- 5) Hidrólisis.
- 6) Reacciones varias.

Para estudios metabólicos con células de *Digitalis* se utilizan como substratos precursores lejanos e intermediarios de la síntesis de cardenólidos, así como los propios cardenólidos. La transformación de colesterol en cardenólidos presupone una rotura de la cadena lateral, el enzima responsable de este proceso podía ser identificado en retoños de *Digitalis purpurea*, pero no en cultivos de tejidos establecidos a partir de ellos (Pilgrim, 1972).

Las células de *Digitalis purpurea* metabolizan β -pregnano añadido al medio, pero el proceso biosintético no continúa hasta la formación de cardenólidos. Para estos estudios se utilizaron tanto callos normales, que requieren la adición de sustancias promotoras del crecimiento, como cultivos de callos habituados, que se desarrollan en un medio que carece de estas sustancias. Como ambas clases de tejido de callo mostraban caminos metabólicos similares, la adición de hormonas parecía no ejercer ninguna influencia directa sobre la regulación de la síntesis de cardenólidos (Hirotsani y Furuya, 1975).

En contraste con el comportamiento de los cultivos de callo, los cultivos de hojas y raíces de *Digitalis lanata* y de callos formadores de vástagos de *Digitalis purpurea* respondían al tratamiento con progesterona con una acumulación de digoxina y/o digitoxina.

Entre los diferentes procesos de biotransformación podemos destacar los siguientes:

Glucosidación de cardenólidos en cultivos celulares de *Digitalis lanata*.

Cultivos celulares de *Digitalis lanata* glucosidan cardenólidos adicionados desprovistos del residuo terminal de glucosa. En hojas y cultivos celulares de *Digitalis purpurea* se ha demostrado la existencia de una esteroil-UDPG-glucosiltransferasa ligada a membrana (Yoshikawa y Furuya, 1979). Este enzima glucosila digitoxigenina y digitoxina, sin embargo reacciona más rápidamente con esteroides como el estigmasterol y colesterol, probablemente no pertenece al metabolismo de los cardenólidos en sentido estricto. La glucosidación se ha mostrado como prerrequisito para la translocación y acumulación de cardenólidos en vacuolas (Kreis y Reinhard, 1985a; Dietrich y col, 1987a).

Recientemente Hoelz y col. (1992), después de un estudio sobre el almacenamiento de los cardenólidos en *Digitalis lanata*, han llegado a la conclusión de que en las hojas de la Digital los cardenólidos se almacenan únicamente como glicósidos primarios (Lanatóside A, C, etc.), mientras que los glicósidos secundarios (Digoxina, Digitoxina, etc.) que se encuentran en los extractos de hoja son, o intermediarios biosintéticos o productos de degradación. Además, también han observado que todos los tipos de cardenólidos entran y salen de la célula por simple difusión, y sólo aquellos que contienen la mitad glucosa terminal (glicósidos primarios) son transportados activamente a través del tonoplasto y almacenados en la vacuola.

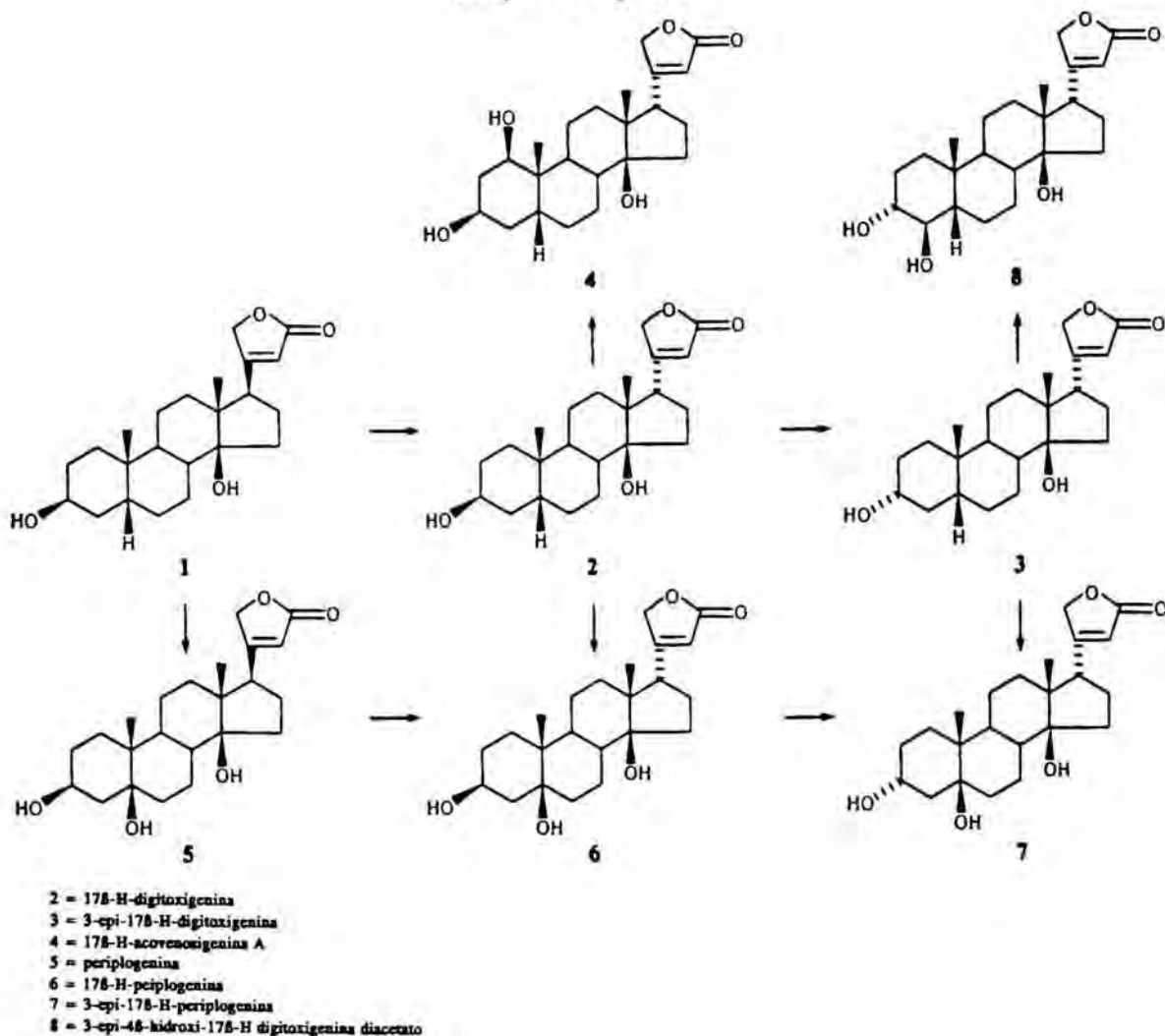
12 β -hidroxilación de cardenólidos en cultivos celulares de *Digitalis lanata* (formación de derivados de digoxigenina).

Algunas cepas celulares de *Digitalis lanata* incapaces de sintetizar cardenólidos *de novo*, hidroxilan derivados de la digitoxina añadidos, en la posición 12 β (Reinhard, 1974; Reinhard y col, 1975; Heins, 1978). Esta reacción está catalizada por un sistema monooxigenasa ligado al RE (digitoxina-12 β -hidroxilasa) (Petersen y Seitz, 1985). El enzima hidroxila varios derivados de la digitoxina, incluyendo la β -metildigitoxina, un compuesto semisintético que se utiliza especialmente en experimentos. La digitoxina 12 β -hidroxilasa necesita O₂ y NADPH₂ como cosubstratos y es inhibida por CO, esta inhibición puede ser revertida por radiación con luz azul ($\lambda = 450\text{nm}$) indicando la participación del citocromo P450 (ver sección I.4.5.2.).

En contraste con la biosíntesis *de novo* de cardenólidos, la 12 β -hidroxilación de la β -metildigitoxina por cultivos celulares de *Digitalis lanata* parece ser de significación económica, y por esto ha sido desarrollada a escala semiindustrial. El proceso debe competir, sin embargo, con la 12 β -hidroxilación de derivados de la digitoxigenina por *Streptomyces* (Natonek y col, 1980; Karoly y col, 1981). Se puede destacar también la existencia de cepas celulares de *Digitalis lanata* que sintetizan cardenólidos *de novo* pero en cambio poseen una baja capacidad para efectuar la 12 β -hidroxilación (Garve y col, 1980).

FIGURA I-30

Biotransformación de Digitoxigenina (1) en cultivos de células en suspensión de *Strophantus gratus*.



Isomerización del anillo butenólido en cultivos celulares de *Strophanthus gratus*.

En 1988 Furuya y col. demostraron por primera vez la isomerización del anillo butenólido en 17β de la digitoxigenina en cultivos de células en suspensión de *Strophanthus gratus*; obtuvieron además derivados β-hidroxilados en C-1, C-4 y C-5 y la epimerización del 3βOH a 3αOH; sin embargo, en ningún caso se produjo la glicosidación. En la Figura I-30 se muestra un esquema de estas biotransformaciones.

INTRODUCCION

Biotransformación de digitoxigenina en cultivos de células en suspensión de *Digitalis purpurea*.

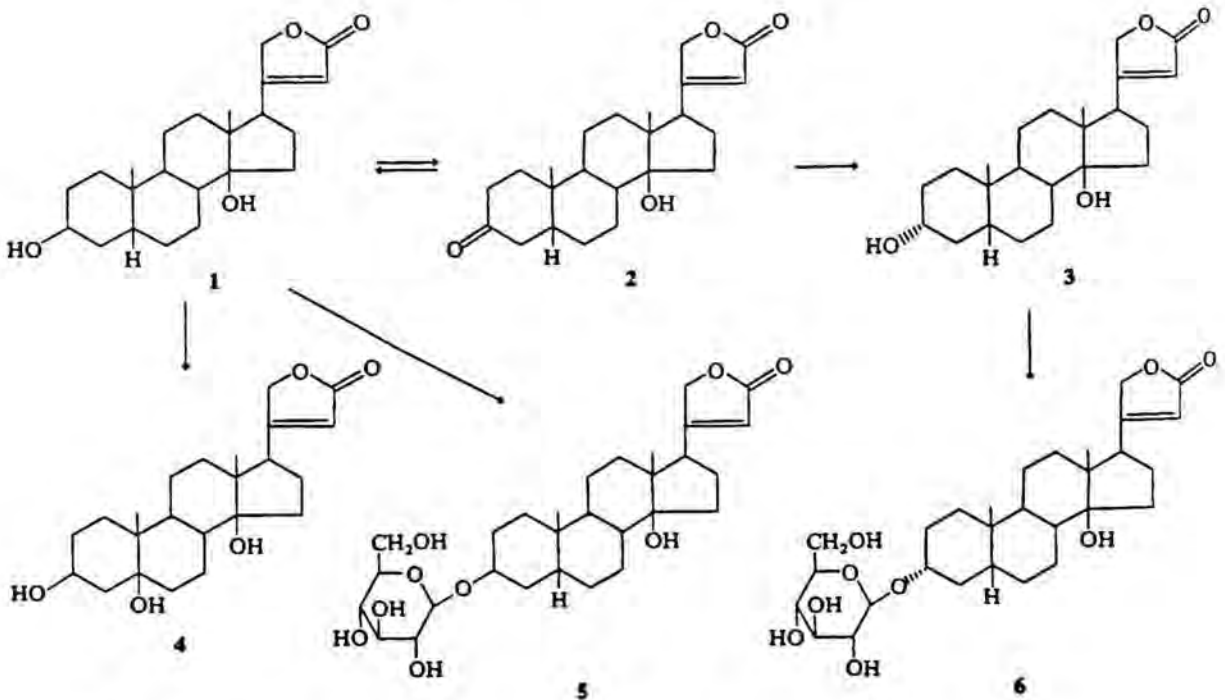
En cultivos de células en suspensión de *Digitalis purpurea* se produce la oxidación de digitoxigenina a digitoxigenona (Stohs y Rosenberg, 1975) y la posterior reducción del grupo ceto a $3\alpha\text{OH}$ (epidigitoxigenina). Como puede verse en la Figura I-31 la epidigitoxigenina y la digitoxigenina son además glucosidadas en estos cultivos; se observó también la 5β -hidroxilación de la digitoxigenina (Hirotani y Furuya, 1980).

A modo de resumen, en la Tabla I-6 se recogen algunas reacciones de biotransformación de la molécula de digitoxigenina por cultivos de células vegetales (Kawaguchi y col, 1989).

Una última cuestión es mantener la capacidad de biotransformación de las líneas celulares. Como ocurre en los microorganismos, pueden darse cambios espontáneos del

FIGURA I-31

Posible esquema para la biotransformación de Digitoxigenina (1) en cultivo de células en suspensión de *Digitalis purpurea*.



- (2) = Digitoxigenona
- (3) = Epidigitoxigenina
- (4) = Peripoligenina
- (5) = Digitoxigenina glucósido
- (6) = Epidigitoxigenina glucósido

INTRODUCCION

TABLA I-6

Biotransformación de la molécula de Digitoxigenina por cultivos celulares de plantas.

Plantas	Oxidación (3b-OH-3-ceto)	Epimerización (3b-OH-3a-OH)	Hidroxilación (1h- 4h- 5h- 12b- 16b-)	Glicosilación	Isomerización (17b- -17a- anillo lactona)
<i>Digitalis lanata</i>	+		+	+ (digitoxósido)	
<i>D. purpurea</i>	+	+	+	+	
<i>Thevetia nerifolia</i>	+			+	
<i>Daucus carota</i>			+		
<i>Sirophanthus gratus</i>		+	+ + +		
<i>S. amboensis</i>		+	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+	+	+ +	+	+

comportamiento en la transformación. La estabilidad de los cultivos celulares no sólo depende de los propios tejidos sino también de las condiciones de cultivo. Un mantenimiento uniforme de las condiciones, combinado con bajos niveles de división celular, es favorable para la estabilización celular. Esto está mayormente garantizado por el uso de reguladores del crecimiento en poca cantidad y por cultivos a bajas temperaturas. En orden a disminuir los cambios espontáneos en el comportamiento de transformación de las líneas celulares, Kreis y Reinhard (1985a) propusieron el uso de las denominadas "cepas de cultivo habitadas". Las células habitadas capaces de crecer en un medio sin hormonas del crecimiento son posiblemente más estables que las células no habitadas, con respecto a los caracteres de biotransformación.

Se recomienda la utilización de técnicas especiales que impidan un cambio en la estabilidad y eviten selecciones repetidas como son:

1) Criopreservación: Se ha adaptado esta técnica a las células de las plantas y se han realizado experimentos con células de *Digitalis in vitro*. Cultivos en suspensión de *Digitalis lanata* mantenidos en nitrógeno líquido mostraron después de su descongelación actividades similares respecto a su capacidad de hidroxilar a la β -metildigitoxina (Seitz y col, 1983; Dietrich y col, 1985).

INTRODUCCION

2) **Inmovilización de las células:** En células inmovilizadas de *Digitalis lanata* tiene lugar una transformación similar de β -metildigitoxina; se ha comprobado que su capacidad de biotransformación está más reducida pero la mantienen mucho más tiempo (Alfermann y col, 1980a,b; Moritz y col, 1982a,b).

Utilidad de los cultivos *in vitro*

Además de la obtención de sustancias secundarias, a las que nos hemos referido anteriormente, los cultivos *in vitro* tienen muchas más utilidades. A partir de un tejido, cambiando las condiciones se puede lograr la formación de brotes de parte aérea o de raíz. En principio se utilizaron estas técnicas para estudiar los procesos de diferenciación y morfogénesis de las plantas, pero pueden utilizarse también para la propagación de plantas regeneradas *in vitro* que mantienen las mutaciones genéticas introducidas en cualquier manipulación.

También pueden cultivarse meristemos libres de tejido vascular, y a partir de ellos pueden regenerarse plantas. La ventaja de esta técnica es que pueden obtenerse plantas libres de virus, bacterias y hongos, ya que sin tejido vascular es difícil la existencia de partículas contaminantes en los meristemos de los que se parte (Bhojwani y col, 1992).

Otra técnica a utilizar es la micropropagación (Figura I-32), que permite producir a partir de yemas axilares de plantas u otros explantes con genotipos selectos gran cantidad de plantas uniformes (Bhojwani y Razdan, 1983; Torrey, 1985; Bera y Roy, 1993). También es posible producir semillas artificiales encapsulando embriones viables (Kitto y Janick, 1985).

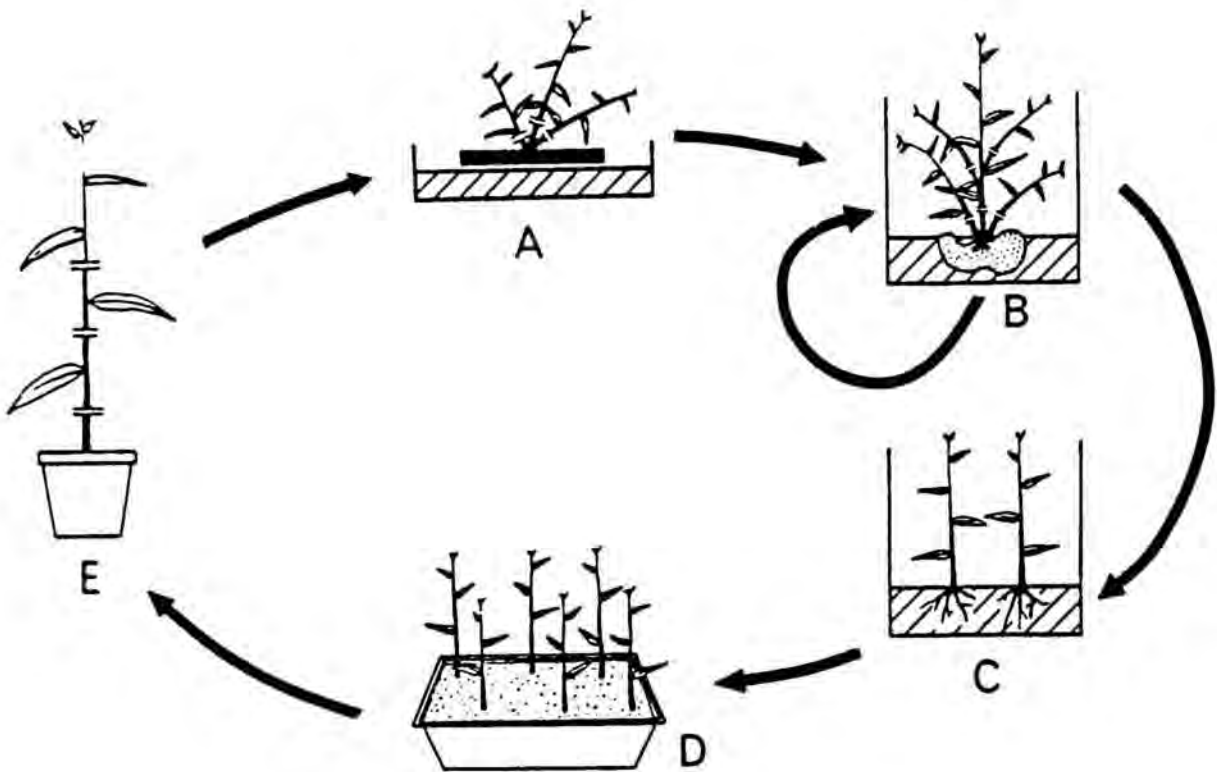
Todas estas técnicas pueden proveernos de plantas en número suficiente y de gran calidad genética.

Aunque las técnicas descritas son útiles, con ellas obtenemos únicamente las sustancias codificadas en el genoma vegetal.

Tradicionalmente se han mejorado las plantas cultivadas por hibridación (recombinación genética) y sistemas de reproducción (autopolinización, polinización cruzada) o multiplicación sexual. Pero las variaciones obtenidas siempre resultan restringidas, ya que el conjunto de genes disponibles para mejorar las plantas estaba limitado a aquellos que se podían transferir entre especies que se reproducían sexualmente. Actualmente, mediante la ingeniería genética, pueden introducirse genes ajenos en las plantas, de este modo, existe la posibilidad de un número indefinido de nuevas combinaciones (Weimberg, 1985; Scowcroft y Ryan, 1986). Así por ejemplo, se están realizando estudios con células de *Digitalis lanata* transformadas por Ti-plásmidos para la obtención de cardenólidos (Moldenhauer y col, 1990).

FIGURA I-32

Diagrama de los pasos que sigue la micropropagación por ramificaciones obtenida a partir de segmentos nodales de una planta.



- E = Se cortan los segmentos de la planta madre y después de esterilizarlos se siembran sobre medio de cultivo.
- A = El medio de cultivo contiene hormonas apropiadas y los brotes axilares se desarrollan en uno o más vástagos.
- B = En un período de 3 a 6 semanas cada vástago desarrolla nuevos vástagos que pueden cortarse y de nuevo repetir el ciclo de multiplicación indefinidamente.
- C = Cuando se han formado suficientes vástagos, parte del material se utiliza para posteriores multiplicaciones de vástagos y otra parte se transfiere a un medio de enraizamiento.
- D = Después del desarrollo del sistema radicular las plántulas se colocan en tiestos con buen drenaje y el material se mantiene en condiciones de humedad elevada durante los primeros 10-15 días.

4.6.2.2. ORGANOGENESIS

Relación organogénesis-síntesis de productos secundarios

La expresión del metabolismo secundario en las plantas superiores es un aspecto típico de la especialización celular; la transferencia de células especializadas química y morfológicamente de una planta entera al cultivo *in vitro* produce una desespecialización y a menudo, una pérdida de la capacidad de síntesis de productos secundarios.

Aunque como hemos dicho anteriormente las células vegetales se consideran totipotentes, no obstante, si se desea establecer un cultivo para la producción de un compuesto que sólo se sintetiza en las raíces de la planta intacta, deben introducirse las condiciones fisiológicas para la aparición de este órgano. La razón que se aduce para esto, es que puede estar reprimida la biosíntesis de algunos compuestos en las células de un órgano, pero si se cambian las condiciones de diferenciación, se entra en otro estado diferente y pueden activarse los genes y expresarse dando lugar al principio activo deseado.

De todas las transformaciones del medio halladas en la bibliografía, se deduce que la inhibición del crecimiento, en general está regida por la citodiferenciación y da como consecuencia la inducción de los enzimas del metabolismo secundario. Esta es la base del efecto de los factores que limitan el crecimiento y dan incremento en la síntesis de metabolitos secundarios.

Se ha observado biosíntesis estable de cardenólidos en cultivos que regeneran yemas o forman embriones somáticos. Los cultivos que constan de tejidos no embriogénicos o que regeneran raíces (Reinhard y col,1975; Lui y Staba,1979; Diettrich y col,1986) carecen de cardenólidos o contienen sólo trazas. Por otra parte, las raíces primarias formadas directamente de explantes foliares de *Digitalis purpurea* tienen bastante cantidad de cardenólidos (Rücker y col,1976,1981,1983). Estos niveles disminuyen, sin embargo, cuando las raíces se aíslan y crecen separadamente (Rücker y col,1983).

Varios investigadores han demostrado que células cultivadas *in vitro* de *Digitalis lanata* y otras especies de *Digitalis* crecidas en un estado indiferenciado producen cantidades insignificantes de cardenólidos o pierden su habilidad para sintetizarlos durante subcultivos repetidos (Luckner y Diettrich,1988). La pérdida de la síntesis de cardenólidos en cultivos morfológicamente desorganizados es debida a la ausencia de enzimas que catalizan la formación de cardenólidos más que a la deficiencia respectiva de precursores. Así, Furuya y col.(1973) observaron que la síntesis de cardenólidos en cultivo de callo no se estimulaba por adición de pregnenolona o progesterona, pero en cambio, sí aumentaba la acumulación de cardenólidos como respuesta al tratamiento con progesterona cuando se trataba de cultivos de hojas o raíces, o de callos formadores de yemas (Lui y Staba,1979; Hagimori y col, 1982c, 1983; Luckner y Diettrich,1988). También, la regeneración de embriones dispara la biosíntesis de cardenólidos bajo condiciones favorables (Garve y col,1980).

INTRODUCCION

Otras investigaciones realizadas con especies de *Digitalis* llevan a la misma conclusión, las células indiferenciadas o los callos sin morfogénesis no tienen capacidad para sintetizar cardenólidos (Pilgrim, 1977; Hagimori y col, 1982a); sin embargo, Vogel y Luckner (1981) indicaron que era suficiente un principio de diferenciación a nivel histológico para iniciar la formación de cardenólidos.

En *Digitalis purpurea*, el descenso de digitoxina bajo la influencia de diferentes sustancias orgánicas, posiblemente se debe a la inhibición simultánea que se observa en la formación de yemas (Hagimori y col, 1982b). Por otra parte, en tejido de callo de *Digitalis lanata* con estructuras embriogénicas, se observa correlación entre la diferenciación celular y la síntesis de cardenólidos (Garve y col, 1980; Nover y col, 1980). Brisa y col. (1991) vieron correlación entre morfogénesis y formación de cardenólidos en *Digitalis obscura*; mientras que en 1992 nuestro equipo provocó mediante diversos tratamientos la formación de parénquima fotosintético, de yemas de parte aérea y de raíz, en *Digitalis purpurea* y después de cuantificar los cardenólidos, no se encontró relación entre la morfogénesis y los niveles de principio activo (Morales y col, 1992a). Las discrepancias en la interpretación, deben atribuirse a diferencias en el medio utilizado, en el explante tomado para iniciar los cultivos y principalmente en el tipo de planta utilizada.

Estos hechos corroboran que la expresión del metabolismo secundario en las plantas superiores, como hemos dicho anteriormente, es un aspecto de la especialización celular, y durante la ontogenia la formación de estructuras donde se acumulan estos productos y la síntesis de enzimas precede a la formación de metabolitos secundarios, por lo cual su síntesis se considera como una parte integral de la expresión de un complejo programa genético.

Inducción de la organogénesis

Se han efectuado numerosos estudios para obtener organogénesis a partir de cultivos de callo de las especies de *Digitalis* y las condiciones óptimas para lograr este crecimiento organizado varían según la especie de la planta y el origen del cultivo *in vitro* (hoja, estambre, hipocotilo, etc.), pero la morfogénesis se da en todos los casos a partir de callo y sigue esta sucesión:

callo --> microglóbulos --> glóbulos --> embriones --> plántulas
con elementos arraigados
traqueidales o embrioides

Hay muy pocos tipos de células de los explantes que son capaces de diferenciarse y formar un callo primario: células parenquimáticas del xilema, células de polen y protoplastos obtenidos de células del mesófilo (Luckner y Dietrich, 1988).

En régimen de 12 horas luz-oscuridad, los microglóbulos, embrioides y plántulas se vuelven verdes (Nover y col, 1980); con respecto al efecto de la irradiación sobre la acumulación de cardenólidos en cultivos celulares de *Digitalis lanata*, debe remarcarse que

INTRODUCCION

la especialización morfológica (formación de estructuras embriogénicas globulares en cierto estado de desarrollo) o la regeneración de hojas (Hagimori y col,1982c) era necesaria para una acumulación de cardenólidos considerable.

En los tejidos de plántulas de *Digitalis lanata* es fácil inducir raíces, hojas y tallos, y propagarlos bajo condiciones de cultivo convenientes. Mientras que en los tejidos juveniles puede llevarse a cabo la propagación clonal de *Digitalis lanata* a partir de la inducción de tallo, en tejido de hoja de plantas adultas y en tejido de callo sólo se observa la formación de raíces pero no la formación normal de tallo (Krtina,1973; Hagimori y col,1980).

Por otra parte, se puede indicar, de modo general, como influyen las hormonas vegetales en el aspecto organogenético:

1) Las auxinas (AIA, ANA, 2,4-D) favorecen la inducción de callo o células indiferenciadas, y normalmente se utilizan en proporciones elevadas respecto a las citoquininas para obtener biomasa (Kuberski y col,1984; Luckner y Diettrich,1985; Reinbothe y col,1990).

2) Las citoquininas (Ki, BA) favorecen la diferenciación, de forma que una proporción alta de citoquininas desarrolla este proceso y a partir de aquí empieza la acumulación de cardenólidos.

3) Si se obtienen embriones, es conveniente eliminar del medio tanto las auxinas como las citoquininas si se quieren regenerar plántulas (Kuberski y col.1984; Reinbothe y col.1990).

En *Digitalis purpurea*, los tejidos de retoños y de plantas adultas responden a la influencia de sustancias promotoras del crecimiento. Explantes de tejido adulto, por ejemplo, responden a las citoquininas formando brotes; a las auxinas AIA y ANA diferenciándose en raíces y al 2,4-D formando callos blandos; y a la Gb formando callos compactos. Por lo tanto, la regeneración y propagación clonal de *Digitalis purpurea* se da no sólo a partir de retoños sino también, y fácilmente, a partir de plantas adultas. Después de aislarlos, estos brotes podían ser propagados y desarrollarse en plántulas en ulteriores pasos de cultivo (Rücker y col,1981).

Las concentraciones y proporciones de hormonas adecuadas para inducir organogénesis pueden verse en la sección I.4.5.1.

Especialmente, la formación del sistema radicular en embriones de *Digitalis* queda inhibida por la citoquinina utilizada, un fenómeno también descrito en embriones somáticos de *Daucus carota* (Reinbothe y col,1990).

Cellárová y Honcariv (1991) han estudiado el efecto de una citoquinina natural, la N⁶-[2-isopentenil] adenina (2iP), sobre la diferenciación en cultivos de tejidos de *Digitalis purpurea*, observando la formación de brotes en los cultivos de callo del 2º subcultivo.

Regeneración

Los cultivos *in vitro* facilitan la propagación vegetativa de plantas que son difíciles por métodos convencionales. Como ya hemos comentado, teóricamente cualquier célula vegetal, excepto las no nucleadas o las que están envueltas por una pared rígida lignificada, son capaces de regenerar el organismo del cual derivan, por eso se denominan totipotentes. Los grupos de células similares forman tejidos, los tejidos y los sistemas de tejidos están organizados en órganos, y la disposición espacial de los órganos constituye el organismo. Las plantas se pueden regenerar *in vitro* a partir de órganos (ápices de raíces y vástagos, yemas laterales y yemas vestigiales, primordios foliares, embriones en desarrollo, etc.); tejidos (médula, corteza, epidermis, floema); células (parénquima, colénquima, granos de polen) y protoplastos.

La Figura I-33 ilustra algunas de las vías para conseguir la regeneración de una planta completa y la Figura I-34 ofrece los pasos seguidos en la regeneración de una planta a partir de protoplastos de hoja (Bajaj, 1974; Sasamoto y Hosoi, 1992; Megia y col, 1992; Wu y Zapata, 1992). Se encuentran muchos casos en la bibliografía de regeneración de plantas por cultivos *in vitro* (Kumari y Saradhi, 1992; Krasnyanski y col, 1992; Vandervalk y col, 1992; Babu y col, 1992; Roy y col, 1992; Tandon y Rathore, 1992).

La regeneración de plantas *in vitro* puede empezar, pues, a partir de una célula simple (Figura I-35). Esto ocurre en la embriogénesis somática, cuando procesos embriogénicos son inducidos en las células somáticas (Martinelli y col, 1993; Fitch, 1993; Giri y col, 1993; Neuman y col, 1993), y en microcultivo de células individuales, cuando células simples son aisladas, efectuando una inducción de divisiones celulares y organogénesis. La Figura I-36 muestra un caso de microcultivo a partir de células de tabaco y la Figura I-37 representa una embriogénesis *in vitro* en células de zanahoria silvestre. Además, los cultivos *in vitro* ofrecen la posibilidad de reproducir los regenerados rápidamente para conseguir numerosas plantas individuales. Aunque se podrían obtener fácilmente a partir de semillas, mediante métodos selectivos, cepas efectivas de *Digitalis lanata* (Weiler y Westekemper, 1979), la posibilidad de la propagación vegetativa *in vitro* debe tenerse en cuenta; los modelos metabólicos de plantas individuales de *Digitalis lanata*, por ejemplo, varían enormemente (Weiler, 1979).

Cultivos de clones, directamente dirigidos hacia plantas individuales seleccionadas, podrían probablemente eliminar la variación y crear plantas uniformes para posteriores propagaciones.

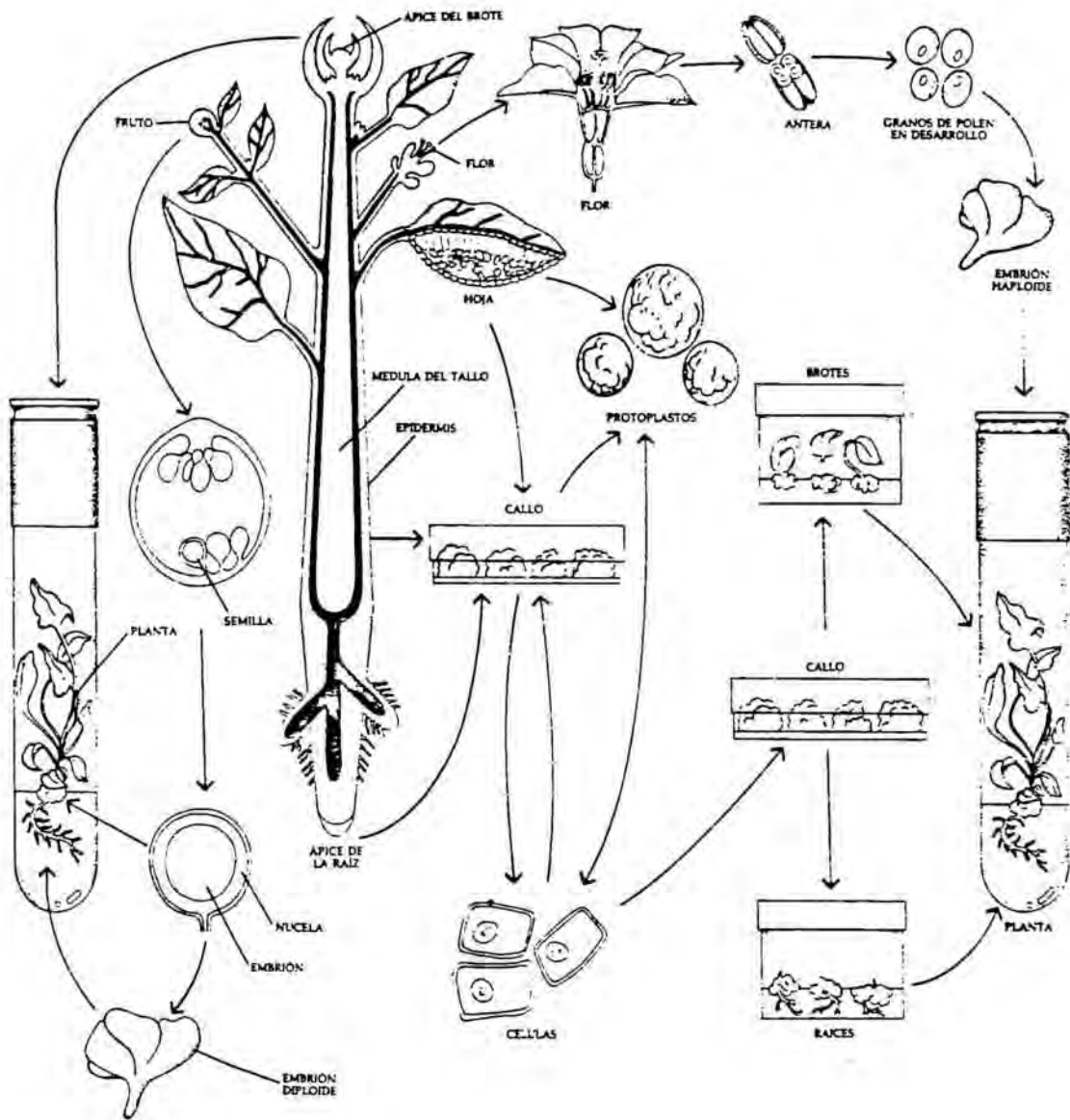
Cuando se empieza a partir de plantas adultas de *Digitalis lanata*, hay dos técnicas especiales *in vitro* que son provechosas para la regeneración y la propagación:

1) Inducción de embriogénesis somática: Cultivando explantes de tejidos de diferentes partes de las flores, se forman callos especialmente estructurados que se vuelven embriogénicos (Garve y col, 1980; Nover y col, 1980; Diettrich y col, 1986). Su desarrollo es elicitado, como hemos dicho anteriormente, por disminución de la proporción auxina /

INTRODUCCION

FIGURA I-33

Regeneración de plantas *in vitro* a partir de órganos, tejidos, células y protoplastos.



citoquinina. El proceso incluye los siguientes pasos:

A) Formación de pequeños grupos de células meristemáticas en colonias de células no especializadas.

B) Desarrollo de colonias separadas de células meristemáticas. En posteriores estadios

INTRODUCCION

FIGURA I-34

Secuencia para el aislamiento, cultivo y regeneración de plantas a partir de protoplastos de hoja.

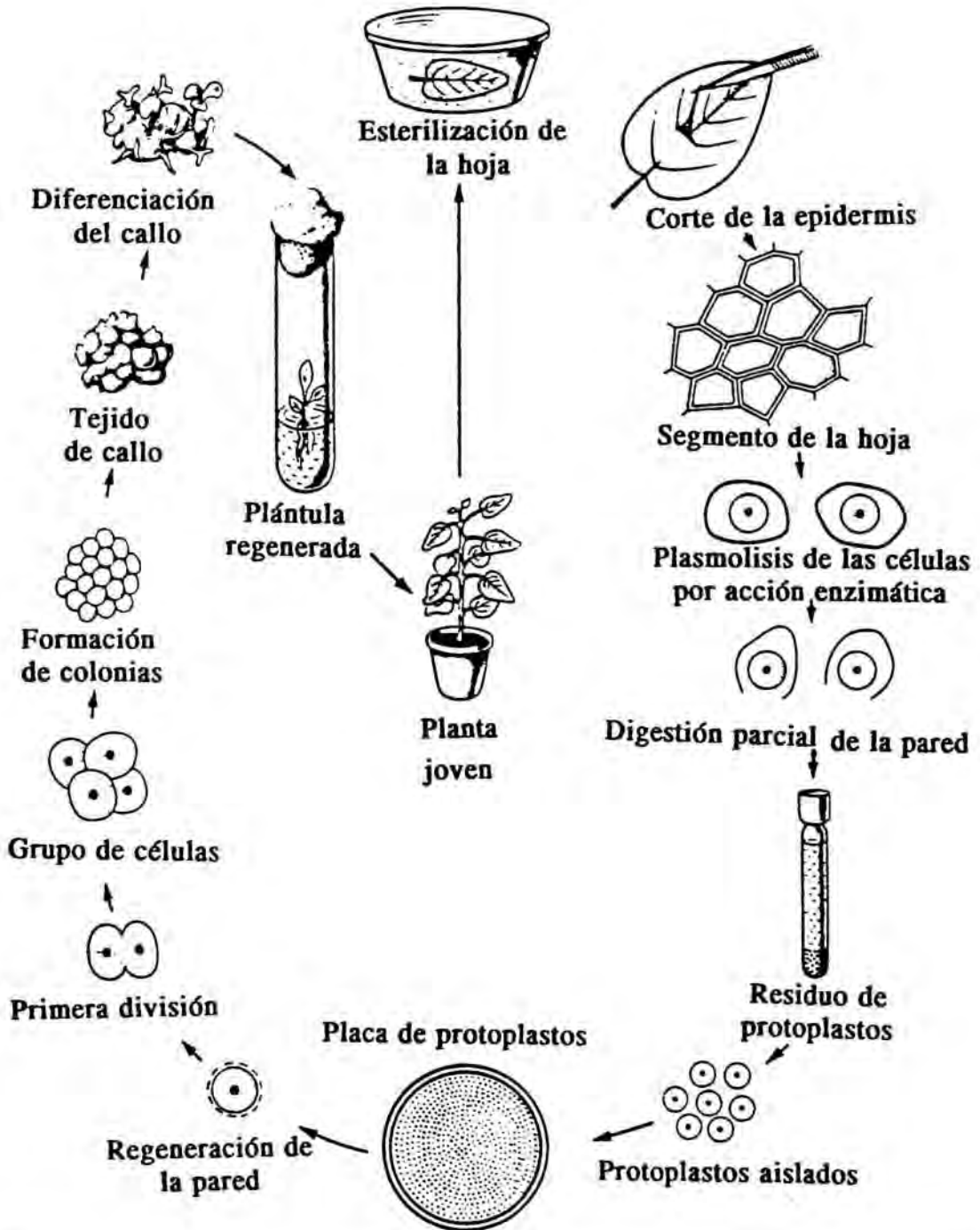
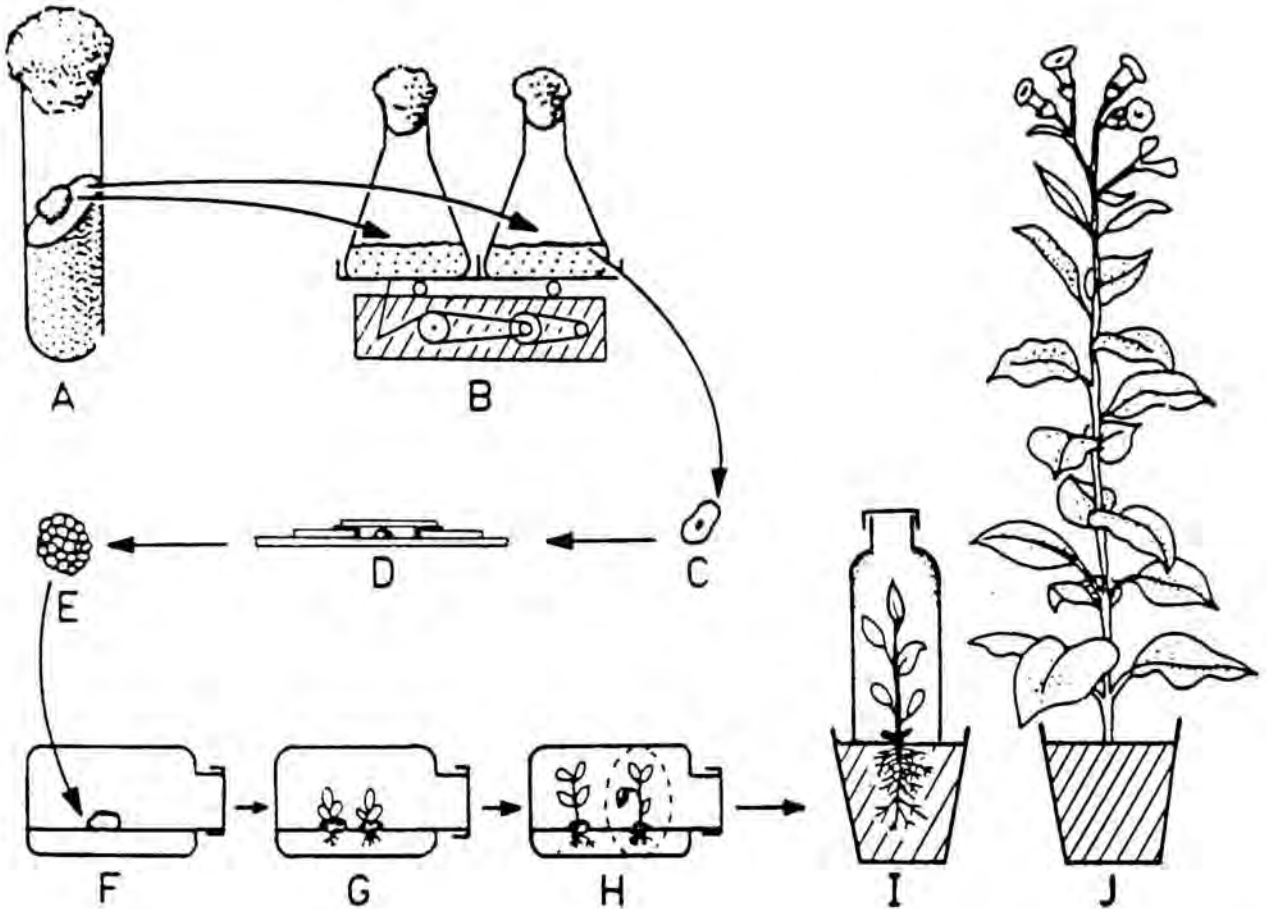


FIGURA I-35

Desarrollo de una planta de tabaco a partir de una célula simple.



- A = Un callo inducido se transfiere al medio líquido y se mantiene en agitación.
 B = El callo es disociado en células simples.
 C y D = Una célula simple se separa del frasco y se coloca en una gota de medio de cultivo en una microcámara.
 E = A partir de repetidas divisiones de la célula se forma un pequeño tejido.
 F = El tejido formado se transfiere a un medio sólido donde desarrolla un callo.
 G y H = El callo puede diferenciarse en plántulas.
 I y J = Cuando estas plántulas se colocan sobre tierra siguen su ciclo ontogénico habitual.

INTRODUCCION

se forman grupos de células pequeñas, poliédricas y poco vacuoladas rodeadas por una capa de células grandes y vacuoladas.

C) Desarrollo de embrioides globulares más o menos redondeados, de color blanco, incapaces de formar cloroplastos (estadio I de embrioides), los cuales más tarde se volvían amarillos y formaban cloroplastos a la luz (estadio II de embrioides).

D) Formación de embriones con forma de corazón, de torpedo o bipolar, que posteriormente se desarrollaban en plántulas con raíces y hojas; la mayoría de estas plántulas, no obstante, eran anómalas y sólo un 1% se desarrollaba en plantas normales durante el cultivo ulterior (Kuberski y col,1984; Luckner y Diettrich, 1988). En la Figura I-38 puede verse un dibujo de todas estas estructuras.

Normalmente, la fuente de carbono influye en la formación de embriones; con maltosa se forman mayores cantidades de embriones que con sacarosa o galactosa, mientras que en la mayoría de los demás cultivos celulares embriogénicos es mejor la sacarosa (Ammirato,1983); la ventaja de la maltosa se observó en *Digitalis lanata* en un medio de cultivo que contenía auxina y citoquinina (Kuberski y col,1984; Scheibner y col,1987). El tamaño de los embriones era mayor (lo cual es señal de un desarrollo avanzado) con sacarosa que con galactosa. Esto está de acuerdo con el hecho de que la sacarosa es mejor nutriente que la maltosa y la galactosa en cultivos celulares de *Digitalis lanata*, sin embargo, el retraso del crecimiento provocado por la maltosa, es favorable al desarrollo normal de embriones durante posteriores cultivos (Reinbothe y col,1990). Comparando la influencia de la sacarosa y la maltosa sobre la organogénesis en nuestro laboratorio, en un estudio previo al presente trabajo, no observamos diferencias respecto a la producción de yemas de raíz y parte aérea (resultados no publicados).

Respecto a la proporción $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ necesaria para incrementar la formación de embriones y la influencia del ácido abscísico (ABA) sobre la misma, pueden verse los estudios de Luckner y Diettrich (1988) y Reinbothe y col. (1990). Aunque la luz produzca un efecto positivo sobre la producción de cardenólidos (ver sección I.4.5.1.), se sabe que la embriogénesis es un proceso independiente de la luz (Kuberski y col.1984).

En las Figuras I-39 e I-40 están representados dos estudios que relacionan embriogénesis-concentración de hormonas (Figura I-39) y embriogénesis-producción de cardenólidos (Figura I-40) en cultivos *in vitro* de *Digitalis lanata*.

Greidziak y col.(1990) han hecho crecer embriones somáticos de *Digitalis lanata* en fermentadores de corriente de aire, obteniendo resultados parecidos en cuanto a su desarrollo y acumulación de cardenólidos a los de los embriones cultivados y crecidos de modo habitual.

2) Cultivo de meristemos apicales:

Schöner y Reinhard (1982,1985) estudiaron cultivos de meristemos apicales de plantas

INTRODUCCION

adultas de *Digitalis lanata* en relación al crecimiento, desarrollo, ulterior propagación y formación de cardenólidos considerando esta técnica como un paso para obtener clones de *Digitalis lanata* a partir de tejidos de plantas adultas.

Otro tipo de cultivo *in vitro* utilizado para la propagación de plantas es el de vástagos. Luckner y Dietrich (1985,1988) obtuvieron vástagos estériles adecuados para el cultivo *in vitro* a partir de callos de *Digitalis lanata*, *Digitalis purpurea* y otras especies, también a partir de plántulas de *Digitalis lanata* y *Digitalis obscura* y de puntas de brotes (meristemos con sus primordios de hojas) de *Digitalis lanata* resultando más conveniente a partir de puntas de brotes, procedimiento que es parte de la clonación *in vitro* de plantas de *Digitalis lanata*. Así se forman brotes hijos a partir de los meristemos axilares de los brotes madre en

FIGURA I-36

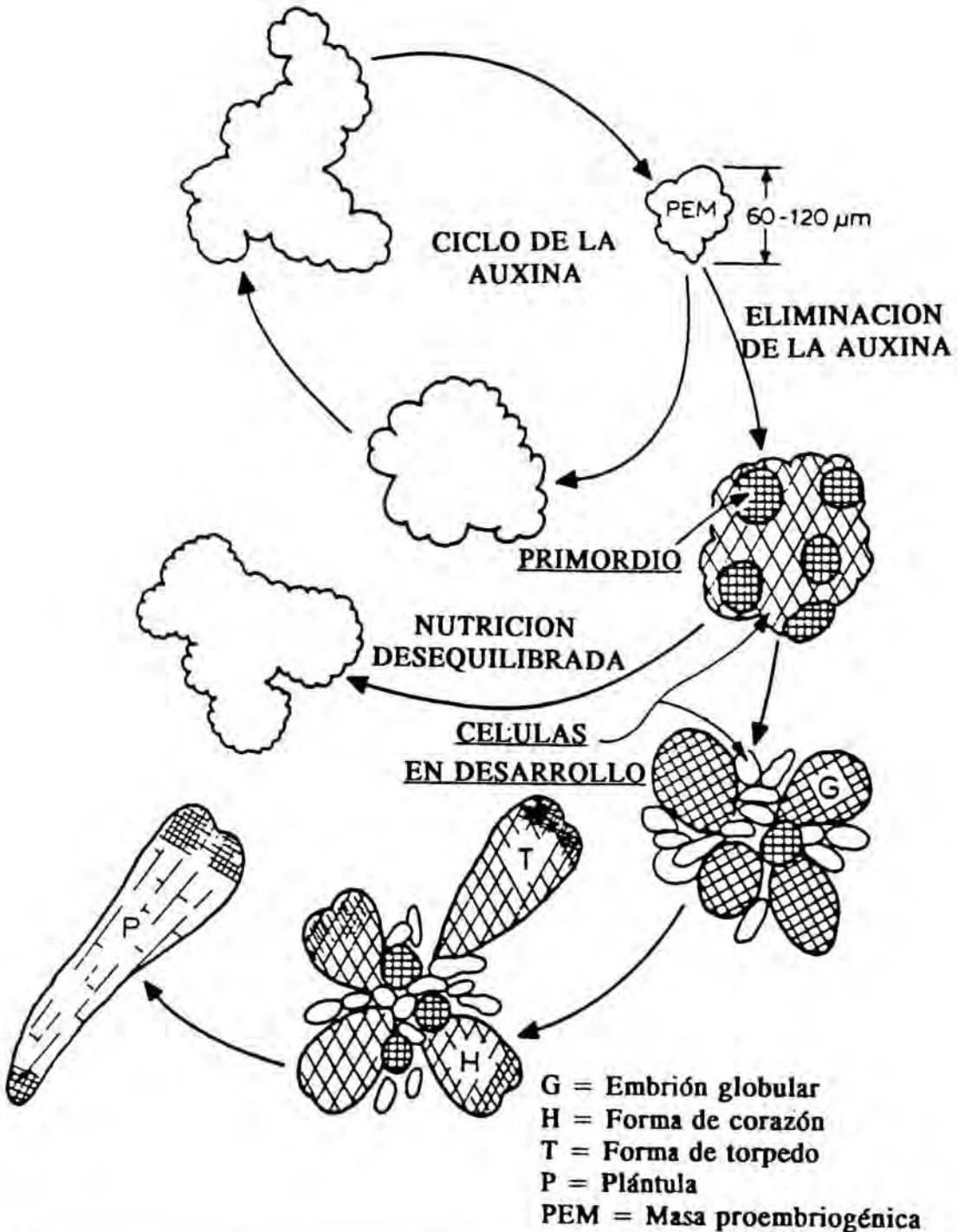
Representación del desarrollo de plantas normales de tabaco a partir de células simples, se aislaron de callo inducido en peciolo.



INTRODUCCION

FIGURA I-37

Representación de una embriogénesis *in vitro* en cultivos de células en suspensión de zanahoria silvestre.



INTRODUCCION

presencia de kinetina, que superan la dominancia del meristemo apical. El cultivo de los brotes se realizó tanto en medio sólido como líquido y los brotes cultivados sintetizaron cardenólidos: En brotes de *Digitalis purpurea*, digitoxina y purpureaglicósido A (Hirotsu y Furuya, 1977); en los de *Digitalis lanata*, lanatósidos A, B y C, digoxigenina y gitoxigenina. Se obtuvieron los mismos patrones de cardenólidos que en las hojas de la roseta basal de la planta madre, a diferencia de lo que ocurría con los cultivos de embriones cuyos cardenólidos difieren en sus mitades glucídicas de los que se utilizan en medicina (ver sección organogénesis).

El inconveniente de este tipo de cultivo *in vitro* está en que los brotes, aunque son muy productivos y fáciles de cultivar, no son adecuados para crecer en fermentadores, por ello no son aptos para uso biotecnológico (Luckner y Dietrich, 1988).

El cultivo de vástagos, sin embargo, ha sido ampliamente utilizado para la rápida propagación de muchas especies debido a sus ventajas sobre los métodos tradicionales (Hu y Wang, 1893). Además, los múltiples vástagos producidos en los cultivos pueden ser utilizados como una fuente alternativa de metabolitos, especialmente en plantas donde la producción es dependiente de la morfogénesis (Heble, 1985), como es el caso de las *Digitalis sp.*

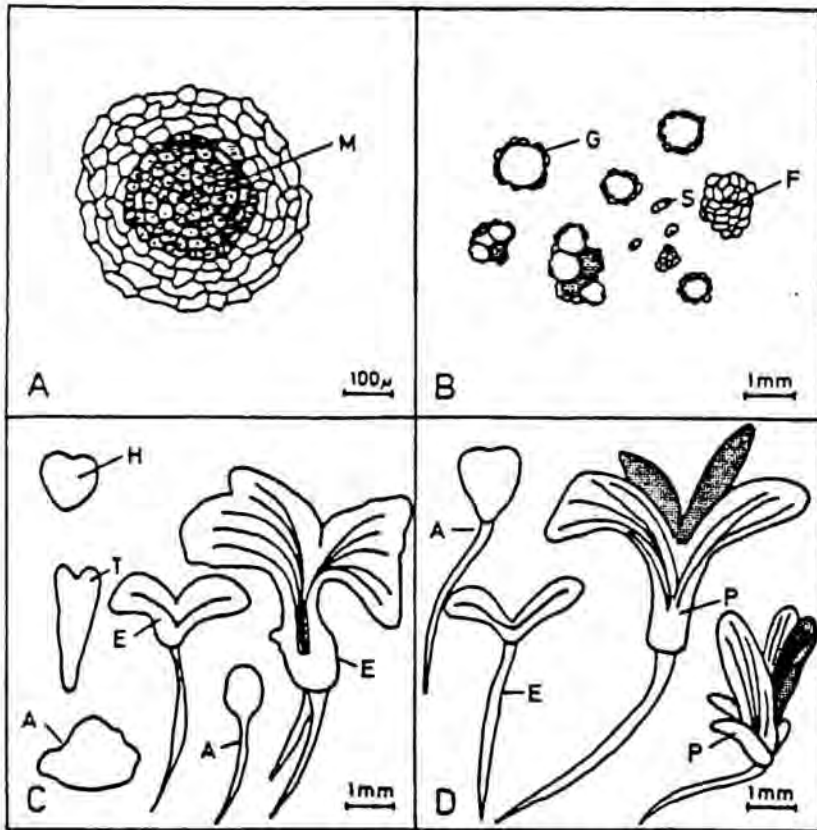
Generalmente, tres medios diferentes son necesarios para lograr la propagación de plantas por cultivos de vástagos: uno para establecer el vástago, otro para su multiplicación y otro para que arraiguen (Hiraoka y Oyanagi, 1988). Frecuentemente, sin embargo, el primero de ellos no es necesario. Herrera y col. (1990) han descrito un procedimiento *in vitro* para una rápida multiplicación de vástagos y su arraigamiento en *Digitalis thapsi*.

En la Figura I-32, ya mencionada anteriormente al hablar del microcultivo, se puede observar la propagación de una planta por cultivo de vástagos.



FIGURA I-38

Estructuras morfológicas en cultivos celulares de *Digitalis lanata*.



A = Colonias celulares con núcleo meristemático (M).

B = Población de colonias celulares. (G) Estructuras globulares formadas a partir de las células meristemáticas; (F) Colonias de células friables (no pueden sintetizar cardenólidos); (S) Células simples.

C = (H) Estructuras en forma de corazón; (T) Estructuras en forma de torpedo; (E) Embriones totalmente desarrollados; (A) Estructuras anómalas.

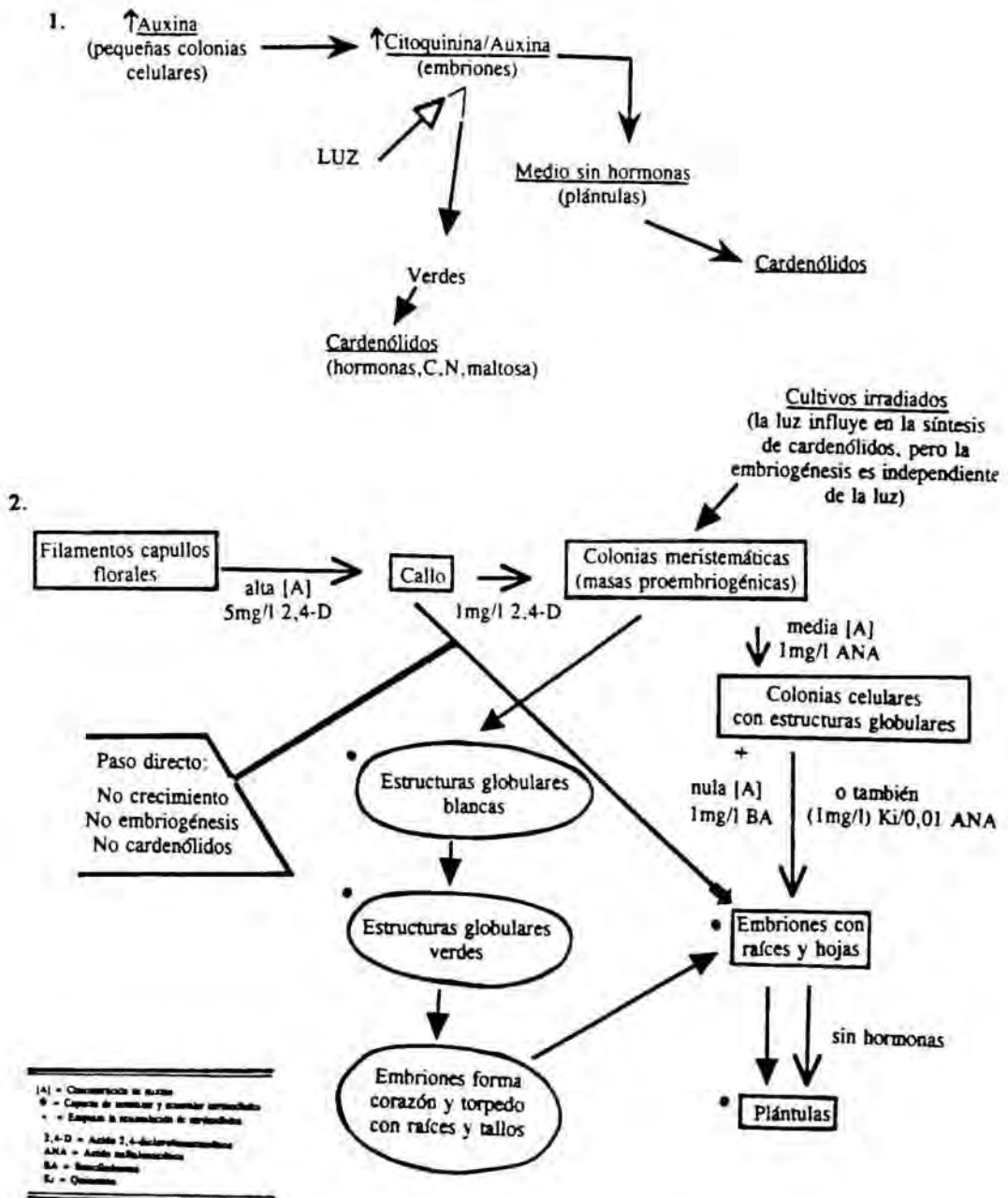
D = (P) Plántulas; (E) Embriones totalmente desarrollados; (A) Estructuras anómalas.

INTRODUCCION

FIGURA I-39

Relación entre la embriogénesis y la concentración de hormonas en cultivos *in vitro* de *Digitalis lanata* según Kuberski y col.(1984).

DIGITALIS LANATA (Kuberski y col., 1984)



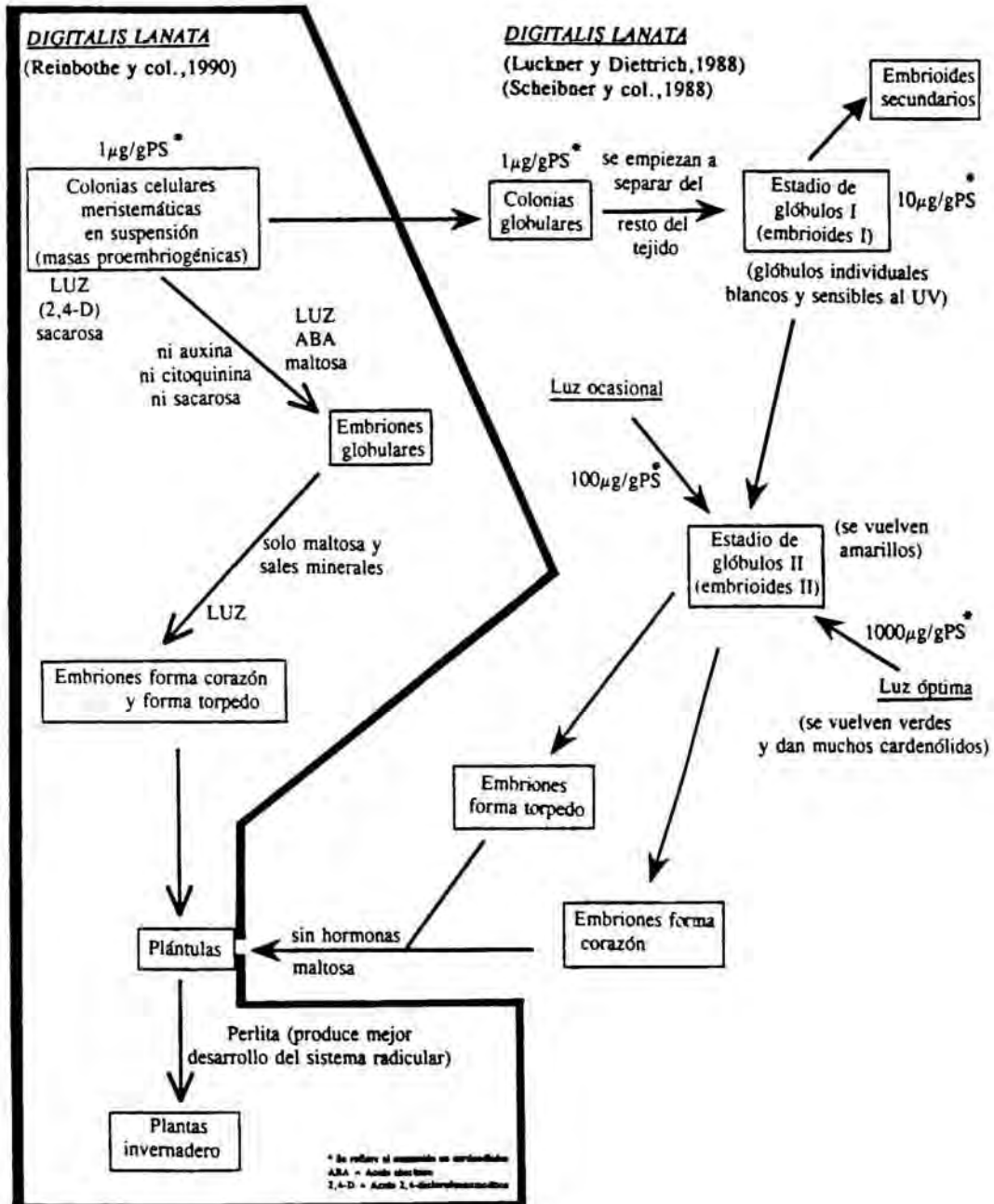
1. Esquema general.

2. Esquema con las hormonas y las concentraciones utilizadas.

INTRODUCCION

FIGURA I-40

Relación entre la embriogénesis y la producción de cardenólidos en cultivos *in vitro* de *Digitalis lanata* según Luckner y Diettrich (1988) y Scheibner y col. (1988); e influencia del ABA en la embriogénesis, en ausencia de auxinas y citoquininas, en cultivos *in vitro* de *Digitalis lanata* según Reinbothe y col. (1990).



II. MATERIAL Y METODOS

II. MATERIAL Y METODOS

1. CULTIVO DEL TEJIDO DE CALLO

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica muy extendida actualmente debido a las ventajas que ofrece sobre el cultivo tradicional. Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* pueden producir pequeñas masas de células indiferenciadas que constituyen el tejido de callo, dicho tejido puede crecer y desarrollarse posteriormente al ser separado del explante inicial constituyendo un cultivo de callo. Para lograr un crecimiento eficiente del tejido de callo y un buen rendimiento en la bioproducción de compuestos naturales es necesario considerar tres aspectos importantes (Street, 1973):

1) La selección del explante, ya que no todos los tejidos de la planta cultivados *in vitro* son capaces de formar tejido de callo apropiado.

2) El medio de cultivo idóneo para el crecimiento del tejido vegetal. Aquí hay que tener en cuenta que los medios de cultivo utilizados son también óptimos para el desarrollo de hongos y bacterias; por eso, y con la finalidad de conseguir un nivel adecuado de asepsia, evitando posibles contaminaciones, todas las operaciones se realizan en una cabina de flujo laminar que establece una corriente continua de aire estéril; los instrumentos utilizados se esterilizan mediante inmersión en etanol de 95% y posterior flameado, y el material fungible se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3) Las condiciones exteriores del cultivo, como la luz (fotoperíodo, longitud de onda e intensidad) y la temperatura.

1.1. OBTENCION DE LOS EXPLANTES

Existen diversos criterios acerca de la parte o tejido vegetal idóneo para la obtención de callo en plantas de *Digitalis* (Smith, 1986).

Como en trabajos anteriores sobre cultivos *in vitro* de *Digitalis purpurea* realizados en nuestro laboratorio (Boada, 1988; Solsona, 1992; Fuente, 1992) la inducción del tejido de callo se obtuvo a partir de plántulas de cinco días de crecimiento.

Con anterioridad a estos trabajos se había ensayado la inducción de callo con peciolo de plantas de seis meses de edad y con plántulas de aproximadamente cinco días de crecimiento. El callo producido por los peciolo era escaso y crecía con dificultad, por el contrario las plántulas producían callo abundante y en poco tiempo.

Para la obtención de dichas plántulas partimos de semillas procedentes de plantas de *D. purpurea* cultivadas en nuestro invernadero (cosecha 1989), en la Figura I-1 de la Introducción puede observarse un ejemplar. Las semillas iniciales que nos permitieron tener cultivos propios habían sido suministradas por el Jardín Botánico Mar y Murtra (Blanes).

El proceso de siembra y germinación de las semillas se realiza en condiciones estériles, por ello, antes de la siembra se esterilizan las semillas con una solución de hipoclorito sódico al 20% durante 20 minutos, y a continuación se lavan abundantemente con agua destilada estéril hasta eliminar totalmente el hipoclorito.

Las semillas estériles se colocan en placas de petri también estériles de 11cm de diámetro, éstas poseen en su parte inferior algodón recubierto con un disco de papel Wathman que previamente a la siembra se ha humedecido con agua destilada estéril y sirve de sustrato sobre el que se colocan las semillas. Por último se sellan las placas con Parafilm.

Las placas selladas se colocan en una cámara acondicionada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura y un régimen de luz de $24\text{W}/\text{m}^2$ durante 12 horas diarias, procedente de plafones con tubos fluorescentes Philips T2 de 40W. La germinación de las semillas tiene lugar aproximadamente a los diez días de la siembra.

1.2. MEDIOS DE CULTIVO

Previamente a la elección de los 8 medios de cultivo estudiados en este trabajo, efectuamos cultivos de inducción y mantenimiento de los callos de *Digitalis purpurea* en varios medios de experimentación que resumimos en la Tabla M-2.

Se ensayaron todos ellos con el fin de obtener una buena inducción de callo y

MATERIAL Y METODOS

posteriormente un elevado índice de organogénesis. El estudio de estos medios fué únicamente morfológico; todos fueron sólidos con excepción del medio L₁, que era un medio líquido, dicho medio requería mucho tiempo para obtener la cantidad de biomasa necesaria para la realización de este trabajo, por lo cual lo desechamos.

Excepto el L₁, todos tienen como base la composición del medio de Murashige y Skoog (MS), que se puede ver en la Tabla M-1; la clase y la concentración de auxina y citoquinina, así como el tipo de azúcar, varían tal como se observa en la Tabla M-2.

El medio L₁ (Kuberski y col.1984) se diferencia en lo siguiente respecto al medio básico (MS) utilizado para los demás medios:

Sales minerales: Iguales al medio MS pero sin CuSO₄ x H₂O ni CoCl₂ H₂O; además la concentración de NH₄NO₃ es de 450mg/l, la de NO₃K de 4.930mg/l y la de CaCl₂ H₂O de 330mg/l.

Componentes orgánicos: La concentración de glicina es de 4,6 mg/l, la de ácido nicotínico de 1mg/l, y no se añade biotina; además lleva los siguientes aminoácidos: L-ala (29,6mg/l), L-arg (3mg/l), L-asn (3,4mg/l), L-asp (1,7mg/l), L-gln (0,2mg/l), L-glu (15,7mg/l), L-gli (4,6mg/l), L-his (0,04mg/l), L-hip (1,2mg/l), L-leu (4,9mg/l), L-lis (1,9mg/l), L-met (0,04mg/l), L-fen (0,04mg/l), L-pro (1,9mg/l), L-ser (2,7mg/l), D,L-tre (4mg/l), L-val (2,2mg/l).

Como resultado de estos ensayos previos se optó por el medio de inducción C₂ (medio que ya se utilizaba con anterioridad), y como medios de control para la experimentación los medios AIA y ANA a los que se añadieron las sustancias cuyos efectos queríamos estudiar, por separado y conjuntamente: la Giberelina GA₃ en una proporción de 0,01mg/l y el Fenobarbital en una proporción de 40mg/l (la mitad de concentración que se utilizó en el anterior estudio sobre callos de *Digitalis purpurea* (Solsona,1992)). Ver Tabla M-3.

1.3.INDUCCION DEL TEJIDO DE CALLO

Una vez germinadas las semillas y transcurridos aproximadamente 5 días, las plántulas se introducen en una solución de hipoclorito sódico al 10% durante 6-8 minutos y después se lavan varias veces con agua destilada estéril separando a continuación las raíces, éstas se desechan y el resto se utiliza como explante para la obtención del cultivo de callo.

Los explantes así obtenidos se colocan en placas de petri, seis por placa, sobre medio de cultivo C₂ solidificado. Una vez colocadas las plántulas se sellan las placas con Parafilm y se colocan en la oscuridad a 25±1°C durante 4 a 6 semanas. Todo el proceso se realiza en la cámara de flujo laminar bajo condiciones estériles.

TABLA M-1

Composición del medio básico de Murashige y Skoog (MS) y del medio de inducción utilizado en este trabajo (C₂).

MEDIO DE MURASHIGE Y SKOOG (MS)

MEDIO C₂

a) Componentes inorgánicos

Macronutrientes:

NH ₄ NO ₃	1650	mg/ml	=
KNO ₃	1900	"	=
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	"	=
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	"	=
KH ₂ PO ₄	170	"	=

Micronutrientes:

Na ₂ EDTA	37,30	"	=
FeSO ₄ .2H ₂ O	27,80	"	=
H ₃ BO ₃	6,20	"	=
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	"	=
ZnSO ₄ .2H ₂ O	8,63	"	=
IK	0,83	"	=
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	"	=
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	"	=
CoCl ₂ .H ₂ O	0,025	"	=

b) Componentes inorgánicos

Sacarosa	30	g/l	=
Agar	10	"	=
Mio-inositol	100	mg/l	=
Glicina	2	"	=
Acido nicotínico	0,5	"	5mg/l
Piridoxina ClH	0,5	"	=
Tiamina ClH	0,5	"	=
Biotina	-		0,05mg/l
Auxina	(1)		2,4-D: 2mg/l
Citoquinina	(1)		BA : 0,1mg/l

(1) Las concentraciones de auxina y de citoquinina varían según el tratamiento

MATERIAL Y METODOS

TABLA M-2

Medios de cultivo ensayados para la inducción del tejido de callo como trabajo previo al presente estudio.

	FITOHORMONAS (mg/ml)					AZUCARES (30g/l)		NOTAS		
	Citoquininas		Auxinas		Giberelinas	Sacarosa	Maltosa			
	Ki	BA	ATA	ANA 2,4-D	GA ₃					
MEDIOS										
C ₁ (1/20)*		0,1			2		X	Buena inducción. No hay diferenciación.		
C ₁ (1/10)	0,1				1		X	Menor inducción que C ₁ . No hay diferenciación.		
C _{1m} (1/20)		0,1			2			X	Apenas induce. No hay diferenciación.	
C _{1m} (1/10)	0,1				1			X	Apenas induce. No hay diferenciación.	
1 (100/1)		1	0,01			0,01		X	Induce pronto. Callos muy pequeños.	
3 (100/1)		1		0,01		0,01		X	Gran diferenciación. Callos muy grandes.	
5 (100/1)		1			0,01	0,01		X	Apenas induce.	
6 (10/1)		1			0,1	0,01		X	Apenas induce.	
ANA-1 (1/10)		0,1		1				X	Induce. Pequeña diferenciación aérea.	
ANA-2 (1/20)		0,1		2				X	Induce poco. También diferenciación aérea.	
ANAGb (10/1)		1		0,1		0,01		X	Callos pequeños. Poca diferenciación.	
AIAGb (10/1)		1	0,1			0,01		X	Callos grandes. Apenas diferenciación.	
E ₁ (10/1)	1		0,1			0,01		X	Escasamente probado. Embriogénesis.	
L ₁ (100/1)	1			0,01					X	Producción lenta de biomasa.
R (0/1)		1						X	Regeneración.	
X (2/20)	0,2			2				X	Poca inducción.	
I ₁ (2/100)	0,02				1			X	Buena inducción.	
Ds (1/0)	1							X	Diferenciación partes aéreas.	
Dm (1/0)	1								X	Diferenciación partes aéreas.

La composición de estos medios corresponde a la del medio C₂ (Tabla M-1) con las variantes aquí indicadas. El medio L₁ es el único que no sigue esta pauta, su composición puede verse en el apartado 2.1.2.

* Proporción Citoquinina/Auxina

El medio de inducción de callo utilizado (C_2) contiene los nutrientes básicos propuestos por Murashige y Skoog (MS) (1962) y está solidificado con Bacto agar al 1%, lleva una auxina de síntesis, al ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético, a una concentración de 2mg/l, y una citoquinina, la benciladenina, a una concentración de 0,1mg/l (Tabla M-1).

Este medio se prepara a partir de soluciones "stock" concentradas de sales minerales, vitaminas y reguladores del crecimiento. Se toman las alícuotas correspondientes de las soluciones de sales inorgánicas y a continuación se añaden los componentes orgánicos. Después de diluir con agua destilada y homogeneizar, se ajusta el pH a $5,80 \pm 0,20$ con NaOH/HCl 0,1N; por último se añade el agar y se ajusta al volumen correspondiente.

El medio de cultivo así preparado se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 121°C , después, en una cabina de flujo laminar, se distribuye en placas de petri de 9cm de diámetro previamente esterilizadas y se deja solidificar.

Como hemos mencionado anteriormente, los medios utilizados para el cultivo de células vegetales son un substrato adecuado para que crezcan hongos y bacterias, sin embargo la adición de fungicidas o bactericidas al medio puede producir fitotoxicidad para el explante; de ahí que no utilizemos este tipo de sustancias en nuestros cultivos pero en cambio sí que preparamos normalmente una mayor cantidad de material por si se producen contaminaciones.

1.4.SUBCULTIVO INICIAL

Una vez transcurridas de 4 a 6 semanas desde el cultivo inicial sobre el medio C_2 el callo inducido (ver Figura M-1) produce suficiente biomasa para proceder a su repicaje en medio C_2 fresco y así mantener el material, o bien para iniciar los subcultivos de crecimiento en los medios de experimentación.

Los cultivos de mantenimiento se pueden ir haciendo a intervalos de 4 a 6 semanas. En nuestro trabajo hicimos una selección de los callos de mayor tamaño, color claro y aspecto compacto que habíamos obtenido al hacer la inducción, de modo que, realizando repetidos subcultivos, a partir de los mismos, obtuvimos callos de aspecto totalmente homogéneo.

Por una parte esto nos permitió tener una línea de cultivo buena que nos aseguraba suficiente material, y por otra disminuyó enormemente la variabilidad. Debido a que los callos seleccionados para todos los cultivos posteriores destacaban por su gran tamaño podríamos pensar que su capacidad de síntesis de metabolitos secundarios podría estar disminuída, sin embargo, aunque esto fuera cierto, no perjudicaba este estudio ya que se basa fundamentalmente en la comparación entre varios medios de cultivo para producir cardenólidos, es decir, no interesan tanto los valores absolutos como las diferencias que encontremos entre ellos.

FIGURA M-1

Aspecto de los callos crecidos en el medio C_2 . A partir de aquí se iniciaba el crecimiento en los 8 medios estudiados.

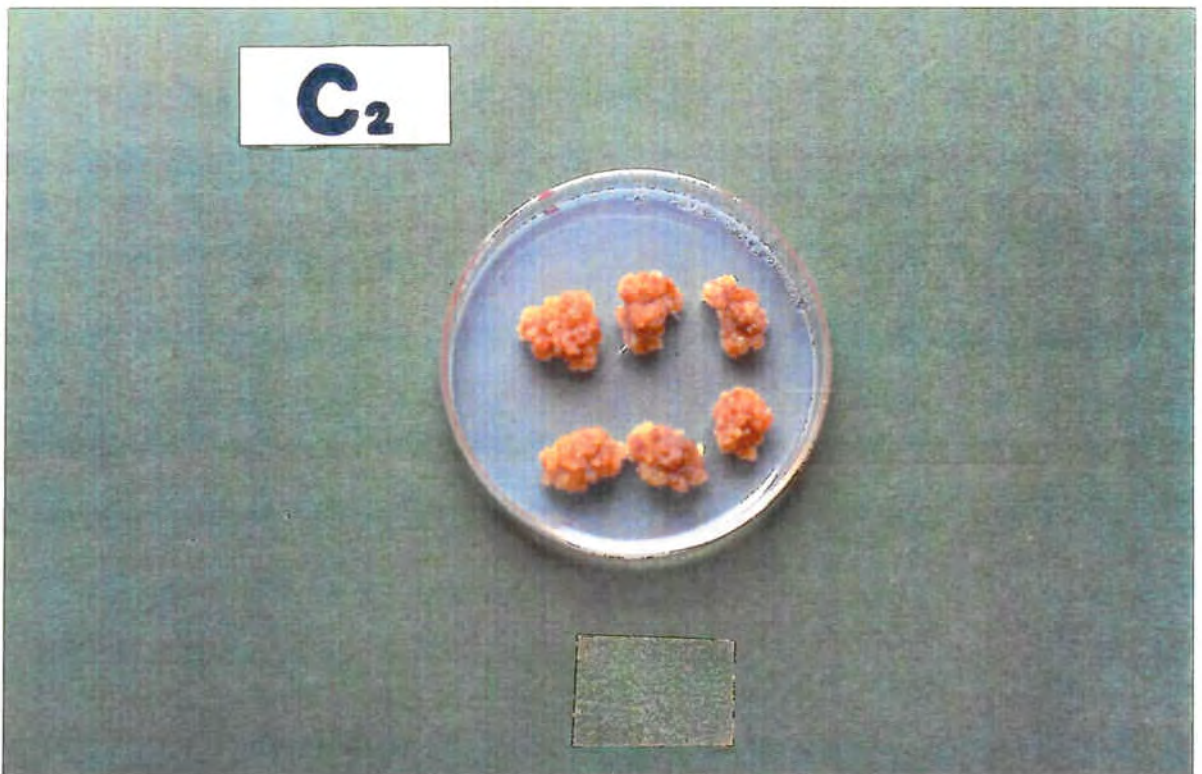


TABLA M-3

Los 8 medios de cultivo en que basamos nuestro trabajo.

<u>AIA</u>	Medio basal MS + AIA 0,1mg/l + BA 1mg/l
<u>AIA Gb</u>	Medio basal MS + AIA 0,1mg/l + BA 1mg/l + Gb 0,01mg/l
<u>AIA Pb</u>	Medio basal MS + AIA 0,1mg/l + BA 1mg/l + Pb 40mg/l
<u>AIA Gb Pb</u>	Medio basal MS + AIA 0,1mg/l + BA 1mg/l + Gb 0,01mg/l + Pb 40mg/l
<u>ANA</u>	Medio basal MS + ANA 0,1mg/l + BA 1mg/l
<u>ANA Gb</u>	Medio basal MS + ANA 0,1mg/l + BA 1mg/l + Gb 0,01mg/l
<u>ANA Pb</u>	Medio basal MS + ANA 0,1mg/l + BA 1mg/l + Pb 40mg/l
<u>ANA Gb Pb</u>	Medio basal MS + ANA 0,1mg/l + BA 1mg/l + Gb 0,01mg/l + Pb 40mg/l

MATERIAL Y METODOS

Con los callos obtenidos se empezaron a hacer subcultivos de crecimiento en los 8 medios que se especifican en la Tabla M-3.

Para ello se llenaban las placas de petri necesarias con los medios de crecimiento a estudiar. En cada placa se colocaban 30ml de medio de cultivo, se dejaba solidificar y a continuación se ponían 6 piezas de callo de 0,1g en cada una. Los callos se pesaban en condiciones estériles mediante una balanza monoplato, con una sensibilidad hasta la centésima de g, colocada en la cabina de flujo laminar. Después las placas se sellaban con Parafilm. Todo el proceso se efectuaba en condiciones estériles.

Las piezas de callo eran preferiblemente de un solo trozo ya que proporcionan un crecimiento más uniforme, además teníamos cuidado en separar y desechar las partes necrosadas procedentes de células que habían agotado el medio.

Las placas sembradas se cultivaban a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ bajo luz blanca procedente de tubos Philips de $40\text{W}/\text{m}^2$, con un fotoperíodo de 14 horas de iluminación; se eligió la luz blanca porque en experiencias anteriores realizadas en nuestro laboratorio (Solsona, 1992) se observó que este tipo de luz provocaba un mayor crecimiento de los callos e inducía una mayor síntesis de cardenólidos.

2. RECOJIDA DE MUESTRA

Siete días después de iniciar el cultivo de callo en las distintas condiciones experimentales, se procede a tomar la primera muestra. A partir de este momento se toman muestras semanales hasta la sexta semana de crecimiento, en la que se da por finalizado el experimento. En ensayos previos se había observado una disminución en la proporción de crecimiento a partir de la sexta semana de cultivo.

De todas las muestras obtenidas se realizaron las siguientes determinaciones:

- 1) **Medida del crecimiento:** **Peso fresco**
Peso seco
Porcentaje de Peso seco

- 2) **Contenido de proteínas en las fracciones microsomal y mitocondrial.**

- 3) Contenido de citocromo P450 en las fracciones microsomal y mitocondrial.
- 4) Actividad NADPH-citocromo P450 reductasa en la fracción microsomal.
- 5) Actividad del complejo enzimático responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol de la fracción mitocondrial.
- 6) Contenido de cardenólidos totales.
- 7) Contenido de Digitoxina.
- 8) Estudio morfológico de los callos: índice de organogénesis.
- 9) Estudio histológico de los tejidos.
- 10) Estudio de la ultraestructura y análisis morfométrico.

Para medir el crecimiento tomamos el contenido de dos placas (12 determinaciones) y realizamos el estudio dos veces; el resto de parámetros se calcularon a partir de dos muestras diferentes determinadas por triplicado. En todos los casos se tomó como valor la media de los resultados obtenidos en cada caso.

3.MEDIDA DEL CRECIMIENTO

3.1.DETERMINACION DEL PESO FRESCO

En los 8 medios estudiados, para obtener los valores de Peso fresco (PF) se partió de dos placas de petri en las que se habían colocado 6 callos de 0,1g en cada una, como hemos

MATERIAL Y METODOS

dicho anteriormente el estudio del crecimiento se realizó por duplicado.

La determinación se realizó pesando individualmente los callos correspondientes a cada muestra en un pesafiltros previamente tarado.

El número de callos utilizados para obtener los pesos frescos fué de 12 en cada uno de los dos estudios (un total de 24 muestras). Se cuidaba especialmente el separar cualquier resto de medio de cultivo que pudiera quedar adherido antes pesar.

3.2.DETERMINACION DEL PESO SECO

Una vez determinado el Peso fresco los callos se colocaban en una estufa de desecación a 60°C hasta peso constante, obteniéndose los valores correspondientes de Peso seco (PS).

El porcentaje de Peso seco se expresaba en gramos de Peso seco por gramo de Peso fresco multiplicado por 100.

4.CONTENIDO EN PROTEINAS DE LAS FRACCIONES MICROSOMAL Y MITOCONDRIAL

4.1.METODO DE EXTRACCION DE LAS FRACCIONES MICROSOMAL Y MITOCONDRIAL

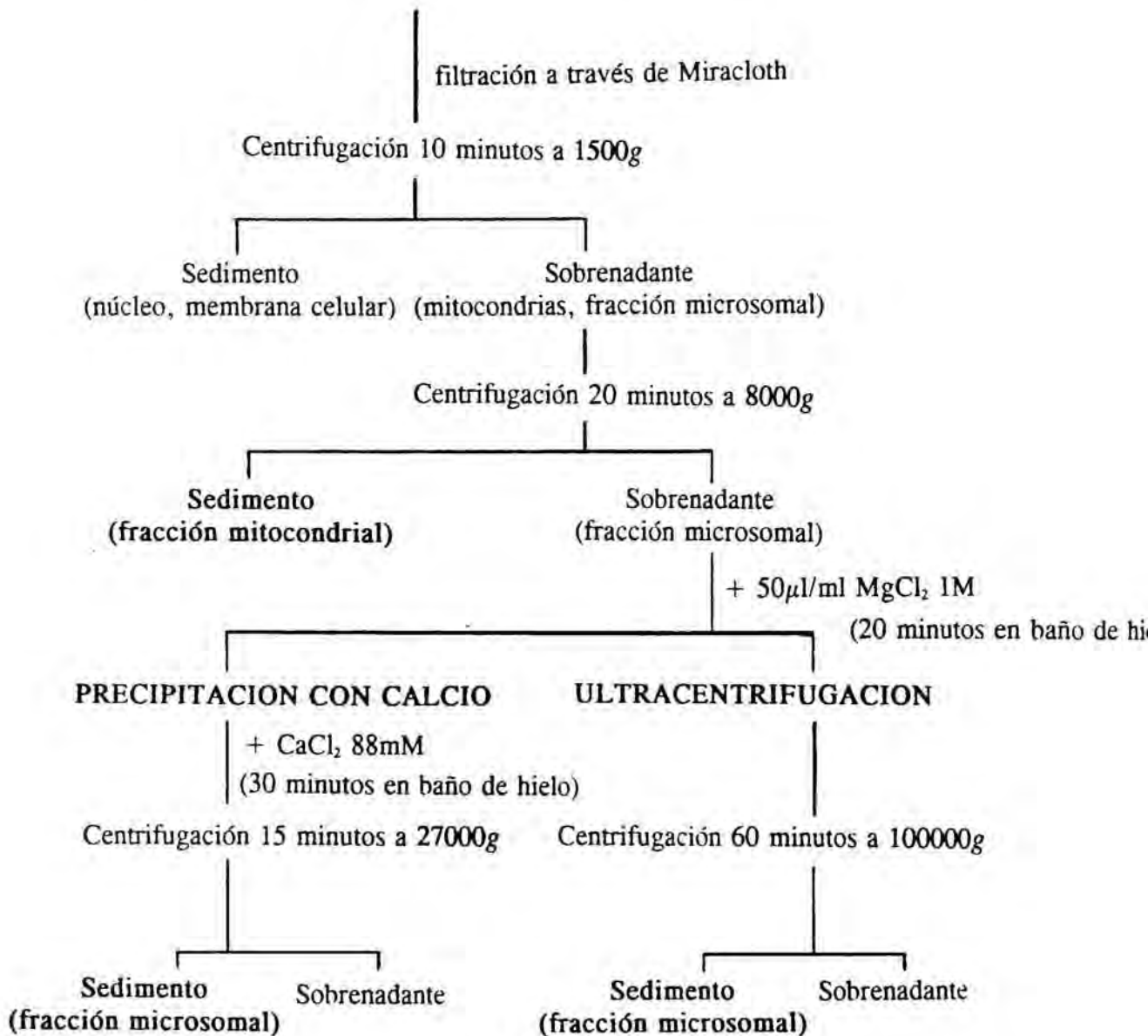
La fracción microsomal de una célula se puede definir como la porción del sobrenadante que queda después de separar el sedimento mitocondrial, y que sedimenta mediante la aplicación de una fuerza centrífuga de 100.000-250.000 g durante 60-120 minutos. En nuestro caso esta fracción está formada por fragmentos de la membrana plasmática, retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso y sistema de Golgi. A diferencia de lo ocurre con los orgánulos intracelulares (mitocondrias, lisosomas...) el retículo endoplasmático se rompe profusamente por homogeneización, y los fragmentos de membrana se unen para formar vesículas debido a la centrifugación. Estas vesículas, llamadas microsomas, contienen por tanto las proteínas correspondientes a las membranas de los orgánulos anteriormente citados.

MATERIAL Y METODOS

FIGURA M-2

Esquema del proceso de extracción de las fracciones mitocondrial y microsomal

Callo + tampón de homogeneización (baño de hielo)



4.1.1. EXTRACCION DE MEMBRANAS

La extracción y homogeneización se basa en el método propuesto por Petersen y Seitz (1985) para cultivos de células de *Digitalis lanata*.

Para minimizar la degradación de los enzimas presentes en los tejidos, es importante no superar los 4°C en ninguno de los pasos de la extracción; de modo que para obtener el homogeneizado todos los aparatos y soluciones que se utilizan deben permanecer en un baño de hielo antes de empezar el proceso.

Para homogeneizar el tejido de callo, éste se coloca en un homogeneizador rodeado de hielo, se añade 1ml del tampón de homogeneización o de extracción de membranas por gramo de PF, y se tritura el tejido, cuidando de no hacer un frotamiento demasiado riguroso que pudiera elevar la temperatura en exceso produciendo la desnaturalización de las proteínas, entre ellas los enzimas.

La composición del tampón de extracción de membranas según Stewart y Schuler (1989) es: PO_4Na_3 0,1M; EDTA 1mM; sacarosa 0,25M; β -mercaptoetanol 10mM; triton X-100 0,1%; fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF) 1mM; leupeptina 5 $\mu\text{g/ml}$ y pepstatina 5 $\mu\text{g/ml}$; pH=7,5+0,05. El tampón contiene EDTA para evitar la peroxidación de los lípidos y los iones bivalentes tóxicos que se liberan durante la homogeneización del tejido (Menhard, 1977); también se adiciona sacarosa que confiere hipertonicidad al medio y previene la pérdida de proteínas e iones de los compartimentos unidos a la membrana (Laties, 1974); así como mercaptoetanol que protege los grupos sulfhidrilos de las proteínas; PMSF, leupeptina y pepstatina que evitan la degradación de las proteínas; y triton X-100 que extrae las membranas.

Una vez obtenido el homogeneizado, se filtra por Miracloth prensando el residuo que queda, y a continuación se centrifuga a 1.500g durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada.

En la Figura M-2 puede verse esquematizado el proceso de extracción de las fracciones microsomal y mitocondrial.

4.1.2. SEPARACION DE LAS FRACCIONES MITOCONDRIAL Y MICROSOMAL

El residuo que se obtiene de la centrifugación a 1.500g, formado por células intactas, restos de células y núcleos se desecha, y el sobrenadante, donde se encuentran las mitocondrias y la fracción microsomal, se centrifuga a 8.000g durante 20 minutos para precipitar las mitocondrias; el sedimento es pues la fracción mitocondrial, mientras que en el sobrenadante se encuentra la fracción microsomal.

La fracción microsomal contenida en el sobrenadante se puede separa de dos maneras:

1) Mediante ultracentrifugación.

Se centrifuga el sobrenadante en una ultracentrífuga refrigerada a 100.000g durante 60 minutos. El precipitado que se obtiene se homogeneiza con el tampón de disolución de membranas y constituye la fracción microsomal.

2) Mediante precipitación con calcio.

Este método se basa en que los fragmentos de retículo endoplasmático en presencia de calcio tienden a agregarse, lo cual permite centrifugar a más baja velocidad.

Se adiciona 1ml de CaCl₂ 88mM por ml de sobrenadante; se deja en baño de hielo durante 30 minutos agitando de vez en cuando y después se centrifuga a 27.000g durante 15 minutos. El sobrenadante se desecha y el sedimento se homogeneiza con el tampón de disolución como hemos visto anteriormente, constituyendo la fracción microsomal.

La composición del tampón de disolución de membranas es la siguiente: PO₄Na₃ 50mM; β-mercaptoetanol 1mM; leupeptina 5μg/ml y pepstatina 5μg/ml; pH 7,5.

En este estudio se utiliza un método mixto para intentar asegurar una recuperación máxima de la fracción microsomal:

Al sobrenadante obtenido después de precipitar las mitocondrias se le adiciona CaCl₂ como se ha descrito anteriormente (método 2), se mantiene 30 minutos en baño de hielo y se centrifuga 20 minutos a 49.000g. El precipitado obtenido constituye la fracción microsomal.

Una vez conseguidas ambas fracciones, se homogeneizan por separado con el tampón de disolución ya mencionado añadiendo 0,2ml cada vez hasta completar 1ml, y se determina el contenido de proteínas en cada una de ellas.

Es preferible realizar los análisis correspondientes el mismo día de la extracción, pero si no es posible se pueden congelar los extractos a -20°C un día o a -80°C durante varias semanas añadiéndoles glicerol (20% v/v) sin que ocurran pérdidas apreciables de la actividad enzimática (Lang y col,1981).

En un estudio anterior realizado en nuestro laboratorio (Solsona,1992) se comprobó que no había diferencias significativas en los resultados obtenidos con los extractos microsomales procedentes de los dos métodos descritos anteriormente; por nuestra parte comprobamos que el método mixto utilizado apenas se diferenciaba de los otros dos métodos anteriores.

4.2.DETERMINACION DE LAS PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD

La determinación de la concentración de proteínas es importante para utilizarla como referencia en otras medidas como son las concentraciones de metabolitos o las actividades enzimáticas.

El método que elegimos para la valoración de proteínas fué el de Bradford (1976), por su sencillez y ventajas respecto a otros métodos, como el de Lowry (1951), ya que el complejo que forma es más estable, no precisa un control de tiempo tan riguroso y no presenta tantas interferencias.

En este trabajo ensayamos, sin embargo, previamente los dos métodos (Bradford y Lowry) para determinar las proteínas microsomales y mitocondriales y así poder comparar los resultados y elegir. Observamos más variabilidad con el método de Lowry, por lo que preferimos utilizar el de Bradford.

4.2.1.FUNDAMENTO Y METODO

Se basa en el cambio de absorbancia que experimenta el reactivo Coomassie Brilliant Blue G-250 cuando se une a la proteína. Este reactivo tiene un máximo de absorción a 465nm pero al unirse a la proteína forma un complejo cuyo máximo es 595nm, lo cual permite una determinación espectrofotométrica.

Realizamos el micrométodo, que permite detectar concentraciones de proteína entre 1-20 μ g/ml.

Se diluyen las muestras convenientemente, se cogen 1,6ml de la dilución y se añaden 0,4 ml del reactivo de Bradford, la mezcla se agita en vortex hasta observar coloración homogénea; a continuación se lee la absorción a 595nm en el espectrofotómetro (Hitachi U-2000) ajustándolo previamente a cero con un blanco preparado con 0,4ml de reactivo de Bradford y 1,6ml de tampón de dilución de la muestra (diluído convenientemente). La lectura de la absorción se realizó a los 10 minutos ya que en este tiempo el color producido es estable.

4.2.2.REACTIVOS UTILIZADOS

Reactivo de Bradford

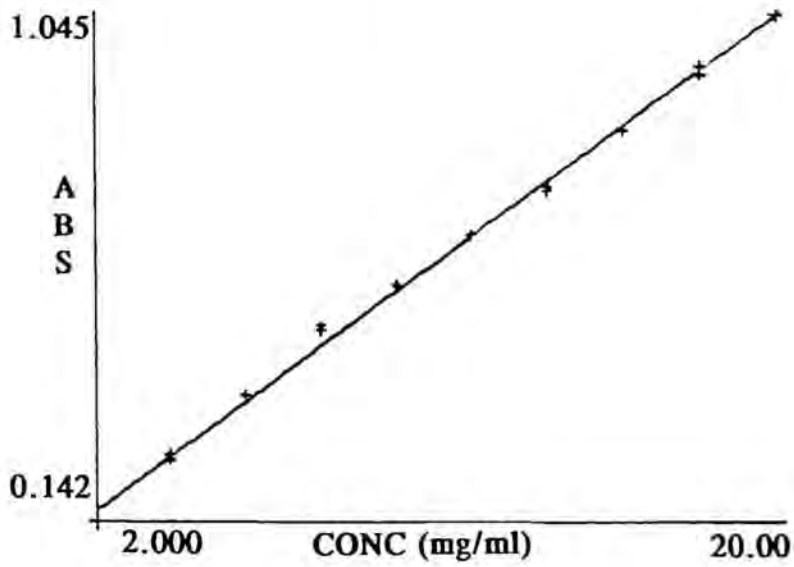
Se utilizó una preparación comercial (Protein assay reagent, Bio Rad) compuesta por:
Coomassie Brilliant Blue G-250 0,01% (p/v).

Etanol 4,7% (p/v).

Acido fosfórico 8,5% (p/v).

FIGURA M-3

Curva patrón de proteínas



$$\text{Concentración} = K_1(\text{ABS}) + K_0$$

$$K_1 = 20,37$$

$$K_0 = -1,313$$

$$r = 0,9986$$

Patrón de albúmina de suero bovina

Se preparó una solución madre de albúmina de suero bovina (Merck) a una concentración de 0,02mg/ml, disuelta en NaOH 0,1M y H₂O. A partir de ella se efectuaron las diluciones convenientes para determinar la recta patrón y también se prepararon las concentraciones utilizadas como controles en cada serie de determinaciones.

4.2.3. CALCULOS

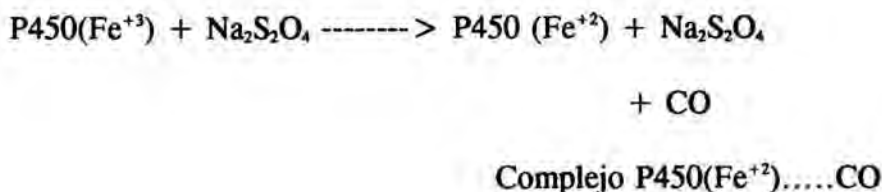
La curva patrón se obtuvo realizando diluciones de concentraciones comprendidas entre 1 y 20µg/ml a partir de la solución madre de albúmina de suero bovina (0,02mg/ml), este rango de concentraciones muestra un comportamiento lineal y sigue la ley de Lambert-Beer. Las concentraciones de proteína de las muestras analizadas se consiguieron intrapolando en la recta patrón (Figura M-3) los resultados de las absorbancias obtenidas al medir la reacción anterior con las diluciones de las muestras.

El contenido en proteína de las muestras se expresa en µg/g de Peso fresco.

4.3.DETERMINACION DEL CITOCROMO P450

4.3.1.FUNDAMENTO Y METODO

El citocromo P450 es una hemoproteína, cuando el hierro del grupo hemo se reduce y se compleja con el monóxido de carbono, se obtiene un espectro de absorción característico que presenta un máximo alrededor de 450nm.



El método que se utiliza para la valoración de los niveles de citocromo P450, en las fracciones microsomal y mitocondrial, es el propuesto por Omura y Sato (1964).

Debido a la elevada turbidez que presentan los homogeneizados de tejido que

MATERIAL Y METODOS

contienen citocromo P450, es necesario realizar las determinaciones en un espectrofotómetro de doble haz, con una cubeta para la muestra y otra de referencia que contrarreste la turbidez.

Primero se añade 1ml de tampón TRIS ⁽¹⁾ 0,1M pH 7,4 en cada cubeta (la de referencia y la de la muestra); se agitan las muestras en el vortex y se añade una cantidad de muestra igual en cada cubeta, seguidamente hacemos un recorrido entre 400 y 500nm comprobando que a 420nm no aparezca ningún pico prominente que sería un producto de degradación del citocromo P450. Después adicionamos unos cristales de ditionito sódico a las dos cubetas y agitamos, procuramos no añadir un exceso de agente reductor ya que hubiera podido destruir la hemoproteína. Seguidamente la cubeta con la muestra problema se borboteaba con monóxido de carbono durante 1 minuto. La forma reducida del citocromo P450 es relativamente inestable, por eso es importante borbotear con el CO tan pronto se añade el ditionito. El flujo de gas debe ser, aproximadamente, de una burbuja por segundo, pues un exceso provocaría una desnaturalización de las proteínas. A continuación se hacía un nuevo recorrido entre las longitudes de onda de 400 y 500nm. El complejo formado por la unión del CO con el citocromo P450 reducido posee una absorbancia máxima a 450nm.

4.3.2.CALCULOS

Según la ley de Lambert-Beer la concentración de citocromo P450 de la muestra viene dada por la expresión:

$$A = a \times b \times c$$

A = absorbancia

a = coeficiente de extinción molar

b = paso de luz de la cubeta

c = concentración

El coeficiente de extinción molar de $91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el par de longitudes de onda 450-490, para el espectro del citocromo P450 reducido, fué cuidadosamente determinado por Omura y Sato (1962), esto permite una determinación cuantitativa de esta hemoproteína.

(1) Este tampón lleva glicerol 20% (v/v) para minimizar la conversión del citocromo P450 a citocromo P450 inactivo.

MATERIAL Y METODOS

El cálculo de la concentración de los citocromos P450 microsomal y mitocondrial se hizo en base a la siguiente fórmula:

$$c = \frac{A}{91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0,5\text{cm}}$$

$$a = 91\text{nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

b = 0,5cm (la cubeta de trabajo tenía un paso de luz de 0,5cm).

A = diferencia de absorbancias entre 450 y 490nm.

Los resultados se expresaron como nmoles de citocromo P450 por mg de proteína microsomal o mitocondrial según el caso.

5. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

El modo de actuación del metabolismo *in vivo* implica una serie de reacciones químicas individuales con unas propiedades características, catalizadas por enzimas particulares.

Para poder interpretar resultados experimentales del metabolismo celular es necesario determinar la concentración de proteína enzimática. Si el enzima que nos interesa es un componente de un homogeneizado de tejido, como en nuestro caso, no nos son útiles los métodos no específicos como la determinación de proteína, hará falta utilizar métodos que sean capaces de seleccionar la proteína que nos interesa de la mezcla; los más adecuados son los métodos basados en la especificidad catalítica del enzima. La determinación de la proteína total presente en la fracción estudiada se utiliza con una finalidad comparativa (Butterwoth, 1983).

Hay que tener en cuenta que los resultados dependen totalmente del método utilizado, hasta las alteraciones más pequeñas en cualquiera de los parámetros de ensayo tienen marcados efectos en la actividad catalítica medida. Estos efectos no representan un problema para comparar actividades relativas entre diferentes muestras, si se trabaja con cuidado.

5.1. DEFINICION DE UNIDAD ENZIMATICA

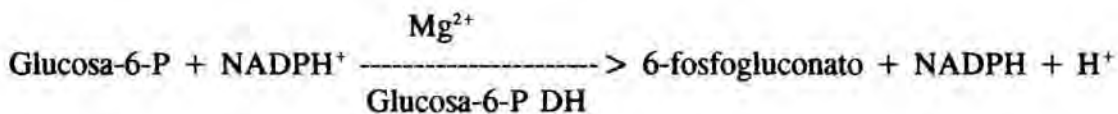
La Comisión de Enzimas de la Internacional Union of Biochemistry (IUB) define la Unidad Enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de $1\mu\text{mol}$ de substrato por minuto en las condiciones ensayo.

Generalmente la concentración de enzima en un homogeneizado de tejido se expresa como unidades de actividad enzimática por mg de proteína total, es lo que se denomina actividad específica (Moss, 1983).

5.2. SISTEMA GENERADOR DE NADPH

El NADPH es un cofactor necesario en muchas reacciones de biotransformación del metabolismo, y sirve como fuente de equivalentes de reducción en las reacciones en que interviene, generalmente son reacciones de hidroxilación y desmetilación.

El NADPH puede adicionarse directamente a la mezcla de reacción, pero su precio es elevado y es muy inestable. Por eso frecuentemente se usa un método alternativo, consiste en generar NADPH mediante la siguiente reacción enzimática:



Utilizamos este sistema generador:

9,74ml Tampón fosfato (NaH_2PO_4) 100mM pH 7,4
0,12ml Glucosa-6-P 250mM
0,060ml Cloruro magnésico 1M
0,060ml NADP^+ 100mM
0,020ml Glucosa-6-P DH 250 U/ml

La mezcla se preparaba justo antes de ser utilizada, se ponían todos los componentes excepto el NADP^+ que se añadía en el momento de utilizar el reactivo, ya que el NADPH generado se degrada muy fácilmente.

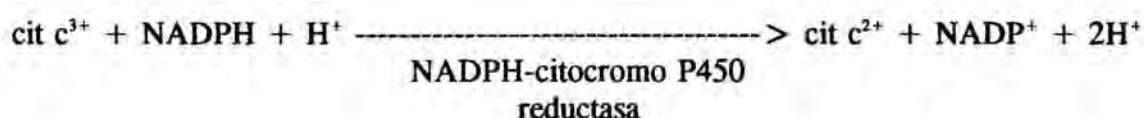
5.3. VALORACION DE LA ACTIVIDAD NADPH-CITOCROMO P450 REDUCTASA

El enzima NADPH-citocromo P450 reductasa juega un papel central en los procesos de óxido reducción de las fracciones microsomales en animales. En las plantas superiores también se ha encontrado este enzima (Gabriac y col,1991; Durst y col,1992), formando parte de la cadena transportadora de electrones implicada en las hidroxilaciones.

Cuando transfiere los electrones a su aceptor natural (el citocromo P450), la reductasa se denomina NADPH-citocromo P450 reductasa, mientras que si el aceptor de electrones es experimentalmente el citocromo c, se denomina NADPH-citocromo c reductasa.

5.3.1. FUNDAMENTO Y METODO

La determinación de la actividad de este enzima se realiza midiendo el cambio de absorbancia a 550nm que se produce debido a la reducción del citocromo c del medio (Benveniste y col,1986) y se expresa en unidades enzimáticas. La NADPH-citocromo P450 (citocromo c) reductasa cataliza la siguiente reacción:



Se utiliza la fracción microsomal directamente sin diluir, que se había mantenido en baño de hielo hasta el momento de ser utilizada. El NADPH es un cofactor necesario en la reducción del citocromo c para la acción de la NADPH-citocromo c reductasa y se obtiene mediante el sistema generador anteriormente citado.

Se prepara la mezcla de reacción que consiste en :

0,5ml del sistema generador de NADPH recién preparado.

0,5ml de solución de citocromo c 100µM en tampón fosfato 100mM pH 7,4 y la atemperábamos a 25°C.

Después se ajusta el espectrofotómetro a cero con agua destilada a 550nm, se pipetea en la cubeta precalentada 1ml de la mezcla de reacción y se sigue durante 2 minutos para comprobar que era estable. Dicha mezcla no debía dar absorción ya que la reacción sólo puede tener lugar en presencia del enzima. Luego se añaden 50µl o 25µl de la fracción microsomal de cada muestra, según la cantidad de enzima que contuviera, se agita, se espera unos instantes, y se lee la absorbancia a 550nm a tiempo cero, y cada 30 segundos durante

MATERIAL Y METODOS

un período de 2 minutos, en el transcurso de los cuales la reacción debe ser lineal, es decir, los incrementos en la absorbancia tienen que mantenerse constantes e inferiores a 0,03; de no suceder así se debe diluir la muestra o añadir menos cantidad.

5.3.2. REACTIVOS UTILIZADOS

Citocromo c oxidado.

Se conserva en forma cristalina congelado a -20°C . La solución $100\mu\text{M}$ en tampón fosfato 100mM pH 7,4 se prepara en el momento de ser utilizada.

Sistema generador de NADPH

Este sistema se ha explicado en el apartado anterior (II.5.2.), pero aquí desarrollamos el modo de preparar algunos de sus componentes:

Glucosa-6-P 250mM pH 7: Se disuelve la Glucosa-6-P sal monosódica (1,77g) en unos 20ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 7 con HCl/NaOH 1N. Se enrasa a 25ml y se dosifican 0,5ml de la solución en tubos Eppendorf que se conservan en el congelador. Este reactivo es estable indefinidamente congelado.

NADP⁺ 100mM pH 7: Se disuelven 7,87g de NADP- Na_2 en unos 80ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7 con HCl/NaOH 0,5N. Se enrasa a 100ml con agua destilada y se dosifican 0,5ml de la solución en tubos Eppendorf como antes. Se conserva estable indefinidamente en el congelador.

Glucosa 6-P DH 250U/ml: Este reactivo se comercializa como polvo en viales de 250U. Añadimos 1ml de agua ultrapura y lo conservamos en el congelador.

5.3.3. CALCULO DEL COEFICIENTE DE EXTINCION DEL CITOCROMO C Y LINEALIDAD DE LAS ABSORBANCIAS

No se encuentra en la bibliografía un valor constante para el coeficiente de extinción molar del citocromo c sino que cada autor le asigna un valor distinto, no obstante todos los valores se encuentran entre 22,6 y 23,1 (Benveniste y col, 1986; Index Merck, 1989; Alani y col, 1990). De ahí que se decidiera calcular el valor del coeficiente de extinción molar del citocromo c para el espectrofotómetro que utilizamos y para nuestra técnica en concreto.

Ante todo se prepara la mezcla de reacción que se utiliza para la valoración de la actividad enzimática de la NADPH-citocromo P450 reductasa, del modo que se ha descrito anteriormente, con todos los componentes menos el citocromo c. Con el espectrofotómetro previamente ajustado a cero con agua destilada se lee la absorbancia de esta mezcla a 550nm (A_0). Seguidamente se añade el citocromo c de modo que su concentración final en la mezcla

MATERIAL Y METODOS

de reacción sea de $50\mu\text{M}$, tal como se utiliza en la técnica, y se añaden unos cristales de ditionito sódico para que todo el citocromo c oxidado pase a la forma reducida; luego se lee la absorbancia de esta solución a 550nm (A_1).

Calculando la diferencia entre los dos valores se obtiene el coeficiente de extinción del citocromo c para una solución $0,05\text{mM}$, multiplicando por 20 este valor se tiene el coeficiente de extinción milimolar que es el que interesa para poder después calcular las unidades de enzima presentes en nuestras muestras.

$$E_{1\text{mM}} = (A_1 - A_0) \times 20$$

El valor se obtuvo realizando el mismo ensayo 8 días distintos, cada día de estos se preparaban dos muestras, como se ha descrito anteriormente, leyéndolas por duplicado. Se calculó la media y la desviación estándar, y el valor encontrado fué de $23,49 \pm 0,36$.

A continuación se comprobó la linealidad de las absorbancias para el margen de concentraciones comprendidas entre 20 y $50\mu\text{M}$ (20 ; 25 ; $33,3$; $41,7$; $43,75$ y $50\mu\text{M}$) de citocromo c oxidado por triplicado, se añadieron unos cristales de ditionito sódico para pasarlo a la forma reducida y por último se leyeron las absorbancias de las soluciones obtenidas a 550nm . Al calcular la recta de regresión se obtuvieron los siguientes valores:

Pendiente	0,02343
Coefficiente de regresión	0,0053
Ecuación de la recta	$y = 0,02343x - 0,053$
Coefficiente de correlación	$r = 0,9998$

Como se observa muy buena correlación podemos deducir que la respuesta entre estas concentraciones estudiadas es lineal. Además hay que tener en cuenta que la pendiente de la recta corresponde a la extinción que daría una solución $1\mu\text{M}$ de citocromo c; si la pasamos a milimolar obtenemos un valor de $23,43$ que es igual al valor encontrado anteriormente.

5.3.4.CALCULOS

Una unidad de actividad NADPH-citocromo P450 reductasa se define como la cantidad de enzima que es capaz de reducir $1\mu\text{mol}$ de citocromo c oxidado por minuto en las condiciones de ensayo previamente definidas.

Los incrementos en la absorbancia cada 30 segundos deben ser constantes e inferiores a $0,050$. En las muestras en que esto no se cumplía se efectuaban las diluciones oportunas o se añadía menos cantidad de muestra a la mezcla de reacción, en este último caso se debe modificar el factor para obtener las unidades de enzima.

MATERIAL Y METODOS

Para calcular las U/ml en la muestra se utiliza la fórmula siguiente, basada en la ley de Lambert-Beer (ya mencionada en el apartado II.4.3.2.):

$$U/ml = \frac{\Delta E/30\text{seg} \times V_t}{E \times d \times V_m} \times 2$$

$\Delta E/30\text{seg}$ = Incremento en la absorbancia cada 30 segundos.

E = Coeficiente de extinción mM del citocromo c.

d = Paso de luz de la cubeta

V_t = Volumen total de reacción.

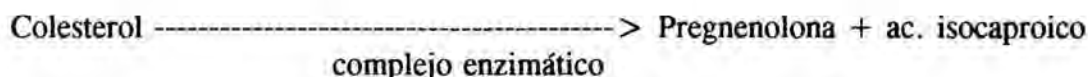
V_m = Volumen de la muestra.

5.4.DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO ENZIMATICO P450scc

La rotura de la cadena lateral del colesterol, paso indispensable en la biosíntesis de cardenólidos, está catalizada por una monooxigenasa de acción mixta localizada en la mitocondria. Como se ha mencionado anteriormente (ver Biosíntesis en el apartado I.4.4.1.d), la monooxigenasa es un complejo enzimático que lleva a cabo tres pasos consecutivos de monooxigenación que conducen a la rotura de la cadena lateral del colesterol y a la formación de pregnenolona y ácido isocaproico (compuesto C_6).

5.4.1.FUNDAMENTO Y METODO

El método que utilizamos para la determinación de la actividad de dicho complejo enzimático, propuesto por Hochberg y col.(1974), mide directamente la radioactividad del fragmento C_6 formado a partir de la rotura de la cadena lateral del $[26-^{14}C]$ colesterol por un procedimiento rápido y simple. El ácido isocaproico se forma en cantidades estequiométricas con la pregnenolona cuando se utiliza colesterol como sustrato.



La fracción mitocondrial se diluyó hasta una concentración aproximada de 250-500 $\mu\text{g/ml}$ de proteína. Esta dilución se mantenía en baño de hielo hasta el momento de ser utilizada.

MATERIAL Y METODOS

El NADPH es un cofactor necesario para que actúe el complejo enzimático responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol y se obtiene mediante el sistema generador explicado en el apartado II.5.2.

La mezcla de reacción consiste en:

- 0,1ml de la suspensión del colesterol marcado
- 0,8ml de la dilución de la fracción mitocondrial
- 0,1ml del sistema generador de NADPH

Se incuban juntos el colesterol marcado y el enzima durante dos minutos en un baño de agua a 30°C y con agitación constante, seguidamente se inicia la reacción con la adición de 0,1ml del sistema generador de NADPH que había estado preincubado a 30°C. Se agita la mezcla inmediatamente y se coge la primera muestra que consiste en una alícuota de 0,2ml a la que se añaden 1,5ml de la solución fría para detener la reacción.

Se iban tomando muestras a intervalos regulares de dos minutos con una pipeta automática, en todas se añadían 1,5ml de la solución antes mencionada para detener la reacción.

Las alícuotas diluídas se filtraban después a través de una microcolumna de alúmina. En este proceso los esteroides quedaban retenidos casi completamente y los fragmentos de la cadena lateral pasaban a través de la columna.

Una vez terminada la percolación se tomaban alícuotas de 100µl de cada filtrado y se añadían a viales preparados con líquido de centelleo Biogreen batch 9109. A continuación se procedía a la determinación de los dpm en un contador de centelleo LKB Wallac 1217 Rack Beta. Se medía el contenido en ¹⁴C de la muestra que corresponde a la cantidad de ácido isocaproico formado. Las operaciones se realizaron a partir de duplicados de tres muestras.

5.4.2. REACTIVOS UTILIZADOS

Substrato marcado: [26-¹⁴C]Colesterol (53.0 µCi/mol)

Se preparaba una solución acuosa de colesterol 6,45mM con Thesit 9%. Primero se preparaba una solución salina y se ponían a calentar unos 150ml. Se pesa el colesterol y se añade el Thesit calentando hasta que todo el colesterol se disuelva. Entonces se añaden unos 80ml de la solución salina caliente; la solución queda turbia y se enfria bajo el grifo hasta que se vuelve completamente transparente, después se enrasa hasta el volumen deseado. La solución se guarda en la nevera y puede conservarse durante un mes.

Sistema generador de NADPH: Se ha explicado en el apartado II.5.2., y la preparación de algunos de sus componentes en el apartado II.5.3.2. (Reactivos utilizados).

Columna de alúmina: Se prepara en una pipeta Pasteur (145mm x 5mm) que sirve como columna de vidrio. Se tapa con lana de vidrio y se llena con aproximadamente 500+100mg de albúmina. El absorbente esta formado por una mezcla 1:1 de dos marcas de alúmina:

Tipo capa fina con partícula de 40 μ m Merck
Tipo columna con partícula de 60 μ m Woelm

Solución de parada: Consiste en una solución de HgCl₂ 0,001M en un tampón de glicina 0,05M pH9,5; el pH se ajusta con una solución de NaOH 0,1N.

5.4.3.CALCULOS

Una unidad de actividad de este enzima se define como la cantidad de enzima que es capaz de producir la rotura de la cadena lateral a 1 μ mol de colesterol en un minuto, en las condiciones de ensayo previamente definidas.

El blanco que se utilizó consistió en dos tubos en los que se efectuaron todos los pasos de la técnica, pero sin añadirles la muestra de fracción mitocondrial, y como patrón se utilizaron otros dos tubos en los que se diluyó una cantidad exacta de colesterol marcado que correspondía a la cantidad teórica que había en los tubos con muestra, así se conseguían los dpm correspondientes a la degradación total del colesterol añadido; y de este modo se podían relacionar los dpm hallados con la concentración de colesterol de las muestras.

6.DETERMINACION DE CARDENOLIDOS

Los cardenólidos son los productos que poseen mayor interés para nuestro estudio, y así el resto de parámetros los estudiamos en función de ellos.

Para determinar el contenido en cardenólidos se han publicado diversos métodos basados en varios tipos de cromatografía: sobre papel (Silberman y Thorp,1953; Sellwood,1956; Linley,1973), en capa fina (Watson y col,1972; Khafagy y Girgis,1974; Lugt y Noordhoek-Ananias,1974; Clarke y Cobb,1979; Szeleczky,1979), HPLC (Orosz y col,1986; Stuhlfauth y col,1987; Ikeda y col,1992; Maekawa y Morimoto,1992; Wiegrebe y Wichtl,1993); en técnicas de radioinmunoensayo (RIA) (Weiler y Zenk,1976; Vogel y Luckner,1981) y ultimamente en técnicas de inmunoensayo ligadas a enzimas (ELISA)

(Hinds y col,1986; Butler y col,1987). Si bien estas últimas empezaron y se han desarrollado principalmente en animales, actualmente existen ya aplicaciones para el material vegetal (Yoshimatsu y col,1990).

En un estudio previo a este trabajo se ensayó la determinación de los cardenólidos por HPLC de forma isocrática, sin embargo existían varios problemas relacionados con la preparación de las muestras:

1) El método de extracción debía ser capaz de purificar suficientemente las muestras de modo que no hubiera interferencias con los picos de cardenólidos (solapamiento de picos, absorciones elevadas de sustancias interferentes que ocultaban los picos de interés, etc).

2) Al intentar purificar las muestras se eliminaban las interferencias en buena medida pero las concentraciones de cardenólidos resultaban demasiado bajas para realizar una determinación satisfactoria.

También se ensayó la determinación por HPLC en gradiente, así se eliminaban más las interferencias que en el modo isocrático, pero seguía el problema de las bajas concentraciones de cardenólidos y además los análisis eran muchísimo más largos.

Al final, decidimos elegir el método colorimétrico de Baljet para la determinación de los cardenólidos totales y para determinar el cardenólido principal de la *Digitalis purpurea*, la digitoxina, optamos por el inmunoensayo (ELISA) ya que no es necesaria la purificación de la muestra y apenas se dan reacciones cruzadas.

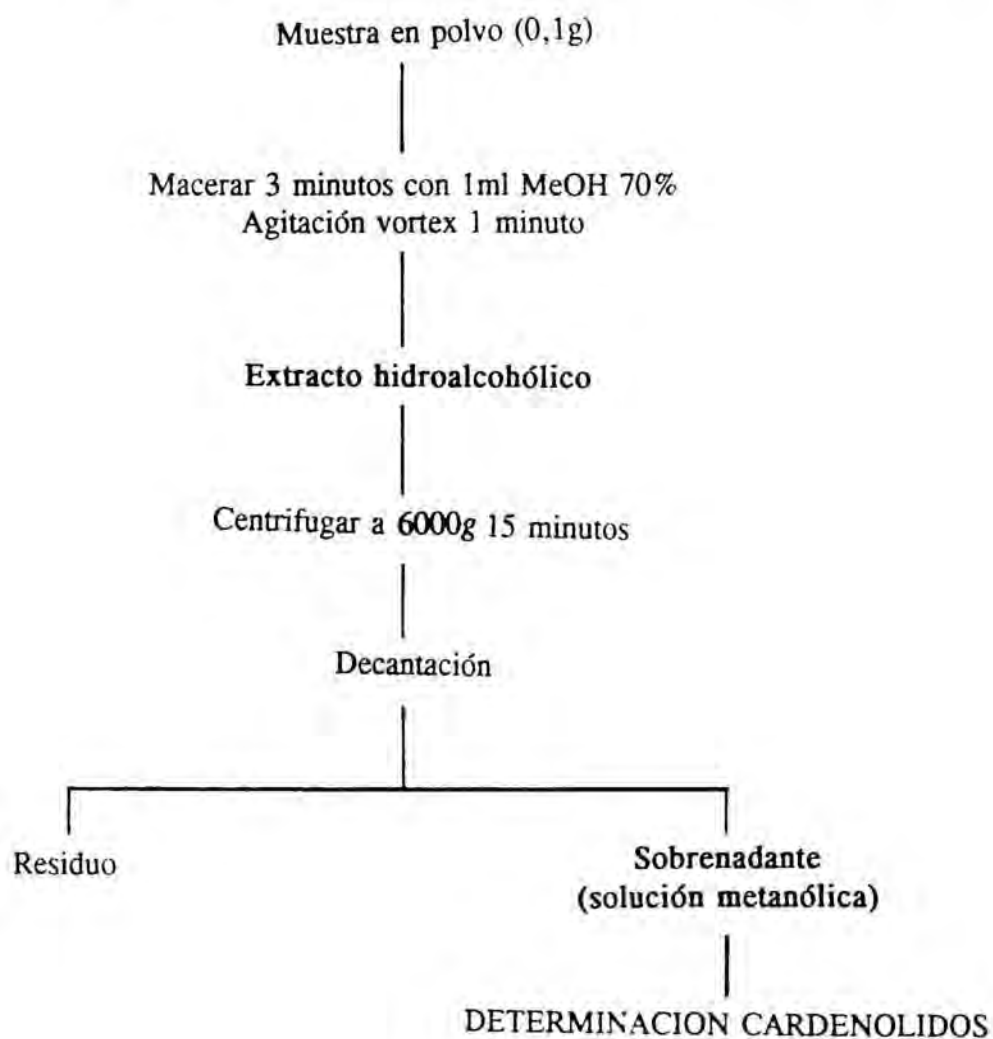
6.1. EXTRACCION DE CARDENOLIDOS

En este trabajo utilizamos como método de extracción el propuesto por Orosz y col.(1986) ya que es un método rápido y sencillo (Figura M-4), con una recuperación casi del 100%, y aunque no purifica suficientemente la muestra para nosotros no era importante ya que los métodos de determinación que utilizamos no se ven afectados por ello.

Las piezas de callo se desecan en la estufa a 60°C hasta peso constante y después se trituran en un mortero hasta conseguir un polvo fino y homogéneo. Se pesan 0,1g del polvo y se maceran en metanol 70% durante 3 minutos como mínimo, luego se somete a una fuerte agitación durante 1 minuto; la presencia de metanol previene la conversión de los glucósidos primarios en secundarios por los enzimas correspondientes; también se puede utilizar etanol en vez de metanol en proporciones entre el 50% y el 70%. A continuación el extracto hidroalcohólico se centrifuga a 6.000g durante 15 minutos, el sobrenadante obtenido se utiliza para la determinación de los cardenólidos totales y de la digitoxina, o se puede llevar a sequedad y disolverlo adecuadamente antes de la determinación.

FIGURA M-4

Esquema del proceso de extracción de cardenólidos



6.2.DETERMINACION DE CARDENOLIDOS TOTALES

Existen diversas reacciones de identificación de los cardenólidos, algunas son aplicables a su determinación cuantitativa y se basan en la presencia del anillo lactónico insaturado de los cardenólidos. El contenido total se determina frecuentemente mediante un ensayo espectrofotométrico basado en la absorbancia al UV (aprox.220nm) del anillo lactónico o en el desarrollo de compuestos coloreados a través de una derivatización.

6.2.1.FUNDAMENTO Y METODO

Para la determinación de cardenólidos totales se sigue el método de Baljet (1918) modificado por Khafagy y Girgis (1974). Se basa en la reacción coloreada provocada por el ácido pícrico al reaccionar en medio básico con el anillo lactónico de los cardenólidos.

Se toman 0,5ml de muestra en solución metanólica, o alícuotas de la extracción que se llevan a 0,5ml con metanol, y se añaden 0,75ml de MeOH, 0,625ml de ácido pícrico 1% y 0,625ml NaOH 1%; después de agitar y esperar 20 minutos, se lee en el espectrofotómetro a 494nm. Previamente se había enrasado el espectrofotómetro a cero con un blanco preparado igual pero sin la adición de muestra.

6.2.2.CALCULOS

Las concentraciones de los cardenólidos totales de las diferentes muestras analizadas se obtuvieron intrapolando en una curva patrón los resultados de las absorbancias obtenidas al realizar la reacción anterior con las muestras. Esta curva se obtuvo a partir de distintas concentraciones de digitoxina en metanol (entre 10 y 100 μ g/ml) las cuales se sometieron a la misma reacción colorimétrica descrita para las muestras. En la Figura M-5 está representada la curva patrón.

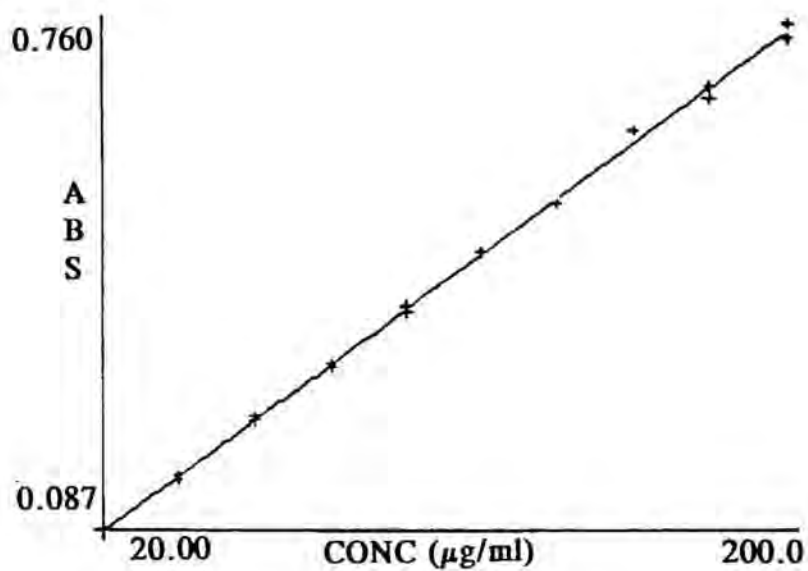
Los cardenólidos totales se refieren a equivalentes de digitoxina ya que los resultados obtenidos siguen la ley de Lambert-Beer entre los valores mencionados (Khafagy y Girgis, 1974).

6.3.DETERMINACION DE DIGITOXINA

La digitoxina es el cardenólido más importante de la *Digitalis purpurea* en cuanto a su utilidad terapéutica. Como hemos comentado anteriormente, se intentó determinar por HPLC tanto de forma isocrática como en gradiente, pero por las dificultades encontradas, se decidió utilizar un test inmuno-enzimático (Enzymun-test Digitoxina,Boeringer Mannheim

FIGURA M-5

Curva patrón de cardenólidos



$$\text{Concentración} = K_1(\text{ABS}) + K_0$$

$$K_1 = 271,73$$

$$K_0 = -3,7703$$

$$r = 0,9995$$

GmbH) propuesto como método de determinación de este cardenólido por Mattersberger y col. en 1985 y evaluado posteriormente por Hoffsümmer y col. en 1986.

6.3.1. FUNDAMENTO Y METODO

Este método se basa en el principio de competición: La digitoxina de una muestra dada y la digitoxina conjugada que se añade compiten para unirse a los anticuerpos anti-digitoxina ligados a las paredes de un tubo de poliestireno (Figura M-6):

Sobre una fase sólida (en este caso tubos de poliestireno) se encuentran adheridos anticuerpos anti-digitoxina, éstos se incuban con una solución que contiene una concentración fija de digitoxina ligada a un enzima (conjugado digitoxina-E) y digitoxina libre (digitoxina problema), la incubación dura hasta que la reacción Ag-Ac alcanza el equilibrio. Después de eliminar el conjugado digitoxina-E que no se ha unido a las paredes del tubo, y de lavar con un tampón, se determina la actividad del enzima adherido a la fase sólida mediante la incubación con un sustrato (en este ensayo H_2O_2) durante un período de tiempo determinado.

La rotura del H_2O_2 está acoplada a la oxidación de un cromógeno (ABTS) que al oxidarse desarrolla color; estas reacciones deben transcurrir en intervalos de tiempo fijos, de modo que para detener la reacción de oxidación del cromógeno se puede utilizar un reactivo de parada que no afecte al color como el NaCN (tóxico), o también, en un ensayo como éste en el que se mide la actividad del enzima unido a una fase sólida, el mejor modo de detener el desarrollo del color es separando el contacto entre la solución de sustrato y el enzima.

La intensidad de color producida es inversamente proporcional a la concentración de digitoxina en la muestra.

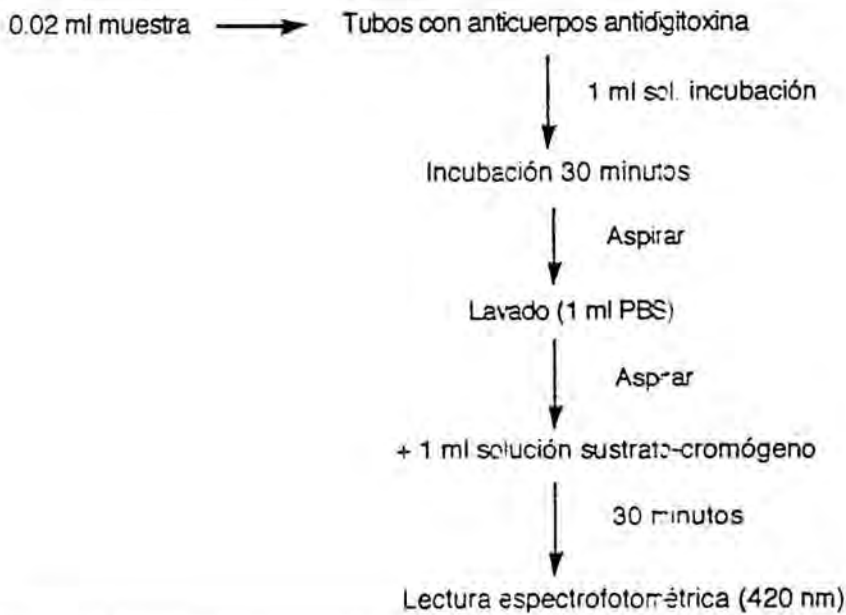
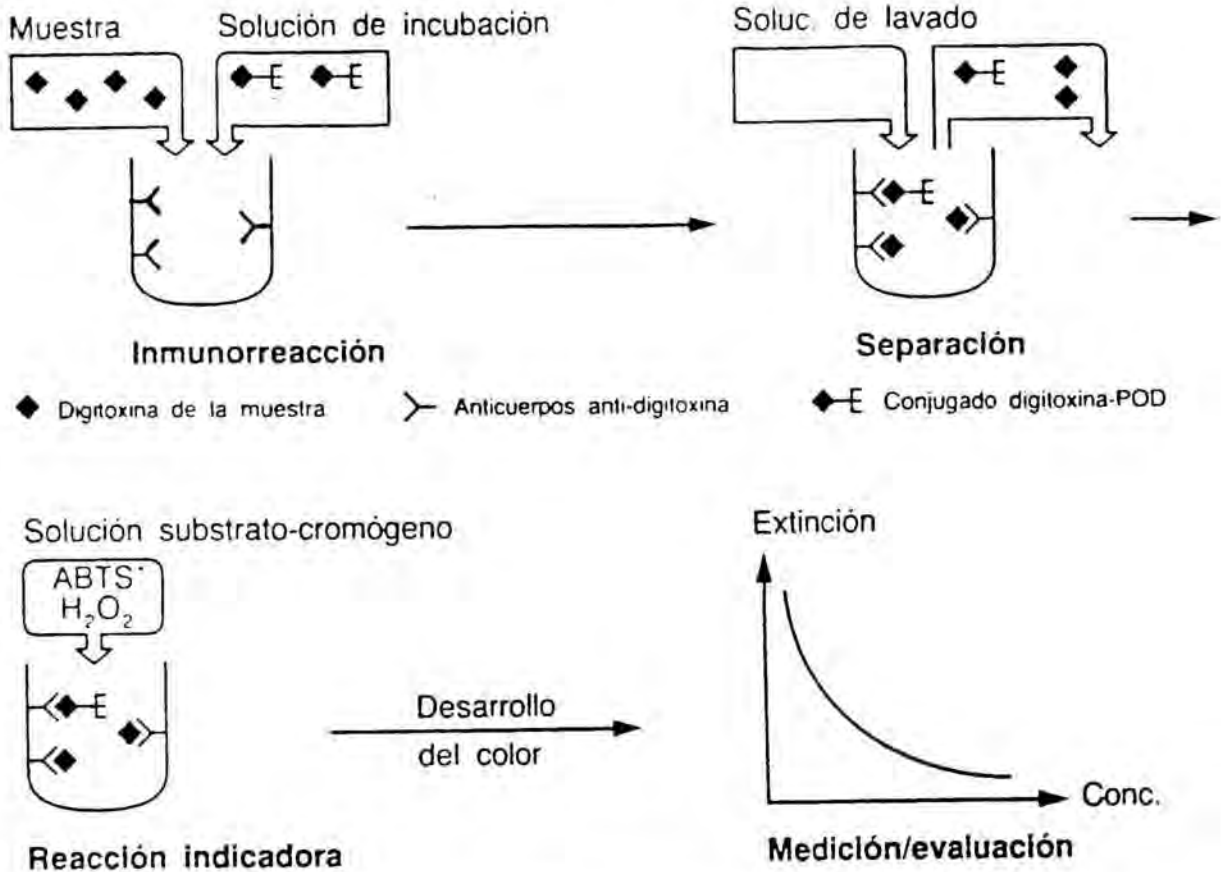
El procedimiento concreto que empleamos para determinar la concentración de digitoxina en las muestras de callo de *Digitalis purpurea* fué:

A tubos de plástico recubiertos de anticuerpos anti-digitoxina se les añade 0,02ml de las muestras y seguidamente 1ml de solución de incubación (conjugado digitoxina-POD) no pudiendo transcurrir más de 20 minutos desde el pipeteado de las muestras. Se deja incubar 30 minutos y luego se aspira el contenido y se desecha; en un plazo de 10 minutos se llenan los tubos con la solución de lavado (tampón PBS) y se vuelve a aspirar (el contacto eventual con las paredes interiores de los tubos no tiene importancia). En el plazo de diez minutos se pipetea 1ml de Sustrato-cromógeno por tubo, que se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente, sin agitación y evitando la exposición directa al sol. Pasado este tiempo se lee la absorción a 420nm.

MATERIAL Y METODOS

FIGURA M-6

Test inmuno-enzimático (ELISA): Esquema del proceso de determinación de la Digitoxina



MATERIAL Y METODOS

6.3.2. REACTIVOS UTILIZADOS

Los reactivos que componen el "Enzymun-test Digitoxina" (Boehringer Mannheim GmbH) son los siguientes:

1. Anticuerpos anti-digitoxina adheridos a las paredes de tubos de plástico.
2. Solución de incubación: Solución "conjugado digitoxina-POD"/Tampón fosfatos 40mM pH 6,8 (1/100).
3. Solución substrato-cromógeno: Tampón fosfato/citrato 100mM pH 4,4; H₂O₂ (perborato sódico) 3,2mM y ABTS 1,9mM.
4. Patrones: Digitoxina en suero humano, 5 frascos con concentraciones de 1,20; 7,80; 14,80; 30,90 y 60,10 ng/ml.
5. Suero control: Digitoxina en suero humano de concentración conocida (19,00±3,8 ng/ml).

Abreviaturas: POD = Peroxidasa (> 1,3 U/ml).

ABTS = 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina ácido sulfónico-(6)]-sal diamónica.

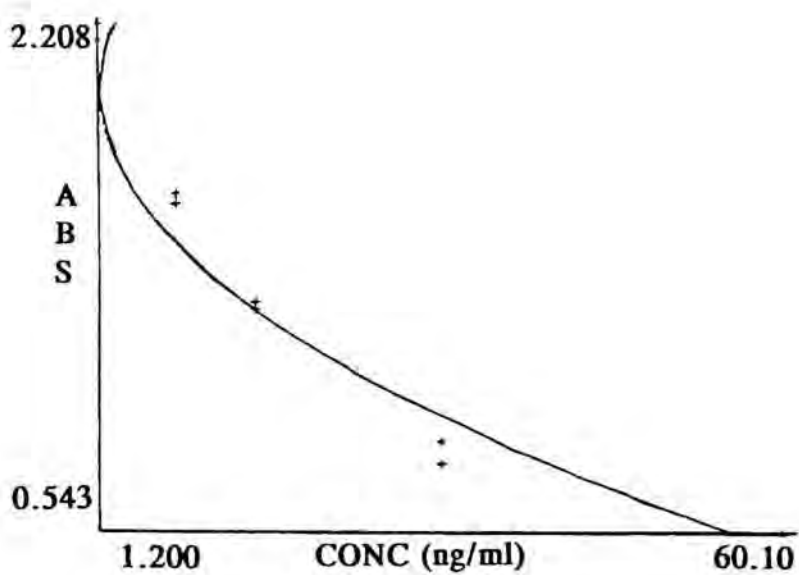
6.3.3. CALCULOS

Cada serie de ensayos requiere realizar una curva patrón comprobando la fiabilidad de los resultados mediante un suero control de concentración conocida. La curva patrón es una curva hiperbólica (curva de 2º orden, Figura M-7) que se prepara con los 5 patrones que lleva incorporados el test (ver apartado II.6.3.2. para las concentraciones). La concentración de digitoxina en las muestras se obtiene intrapolando en esta curva los resultados de las absorbancias obtenidas al realizar el inmunoensayo.

Este método permite un intervalo de medición de 0-60ng/ml con un límite mínimo de detección de 2ng/ml, muestra alta especificidad y no presenta reacciones cruzadas, salvo con compuestos relacionados con la digitoxina: digitoxigenina 87%, mono-digitoxósido de digitoxigenina 99%, bis-digitoxósido de digitoxigenina 80%. El único compuesto que puede interferir en el inmuno-ensayo es la cimarina (53%), pero en nuestro caso no se presenta en las muestras.

FIGURA M-7

Curva patrón de Digitoxina



$$\text{Concentración} = K_2(\text{ABS})^2 + K_1(\text{ABS}) + K_0$$

$$K_2 = 26,27$$

$$K_1 = -104,1$$

$$K_0 = 104,7$$

7. ESTUDIO HISTOLOGICO Y DE LA ULTRAESTRUCTURA

7.1. REACTIVOS UTILIZADOS

Líquido fijador: Paraformaldehído 2%, glutaraldehído 2,5% en tampón fosfato 0,1M.

Para preparar 100ml de este líquido fijador se disuelven 2g de paraformaldehído en 25ml de agua destilada al baño maría a 60-70°C con agitación. Seguidamente se añaden de 1 a 3 gotas de NaOH 1N y se agita hasta tener una solución transparente. Se deja enfriar y a continuación se añaden 50ml de tampón fosfato 0,2M pH 7,4-7,6 y 10ml de glutaraldehído del 25% y se enrrasa a un volumen de 100ml.

Solución tamponada de tetraóxido de osmio al 1%: Se prepara disolviendo el tetraóxido de osmio en una mezcla a partes iguales de agua destilada y tampón fosfato 0,2M.

Resina de Spurr normal:

La resina se prepara del siguiente modo:

Dióxidoglicilciclohexano (ERL)	10g
Diglicileterpolipropilenglicol (DER)	6g
Nonenilsuccinato anhidro (NSA)	26g
Dimetilaminoetanol (DMAE)	0,4g
Dibutilftalato (DBP)	0,8g

Medio de contraste para el microscopio electrónico: citrato de plomo.

Para preparar 50ml de medio de contraste se añaden 1,33g de $Pb(NO_3)_2$ y 1,76g de $Na_3(C_6H_5O_7) \cdot 2H_2O$ y se disuelven en 30ml de agua destilada. Se agita durante 30 minutos y después se añaden 8ml de NaOH 1N y se enrrasa a 50ml con agua destilada. Se utiliza agua destilada hervida con el fin de eliminar la presencia de CO_2 ya que podría ocasionar la precipitación del $PbCO_3$.

7.2. PREPARACION DE LA MUESTRA

La preparación de la muestra empieza con la fijación, que consiste en inmovilizar las estructuras del material de modo que queden lo más próximas posible al estado vivo.

MATERIAL Y METODOS

Se coloca la muestra durante 2 horas en nevera o 2-5 horas a 20°C en líquido fijador, en nuestro caso se utilizó una solución de paraformaldehído 2%, glutaraldehído 2,5% en tampón fosfato 0,1M. Después se procedía a lavar la muestra con tampón fosfato 0,1M pH 7,3. El lavado se realiza sumergiendo la muestra durante 20 minutos en el tampón tres veces y al final una última vez en la que se deja toda la noche.

A continuación se efectúa la osmificación con una solución tamponada de tetraóxido de osmio al 1%. La muestra se deja en esta solución durante 1 hora a 4°C. Seguidamente se realiza un segundo lavado de la muestra con tampón fosfato 0,1M pH 7,3 dos veces durante 20 minutos y por último una tercera vez en la que se deja toda la noche.

El siguiente paso consiste en la deshidratación con solución de acetona de concentración gradualmente creciente, tal como se indica a continuación:

Acetona al 50% 1 vez durante 10 minutos
Acetona al 70% 2 veces durante 10 minutos
Acetona al 90% 3 veces durante 10 minutos
Acetona al 96% 3 veces durante 10 minutos
Acetona al 100% 3 veces durante 10 minutos

Luego se empezaba la inclusión de la muestra en la resina Spurr. Se iniciaba el proceso con diferentes proporciones de Spurr normal y acetona y finalmente se trabajaba con resina pura. La primera inclusión se realizaba poniendo la muestra en Spurr-acetona (1:3) durante 24 horas, después se dejaba 2 horas en Spurr-acetona (2:2) y finalmente 5 horas como mínimo con Spurr-acetona (3:1). Por último se realizaba la inclusión en resina Spurr pura; un primer paso durante 2 horas o toda la noche, un segundo paso durante 2 horas y un último paso entre 1,5 horas y 2 horas. En los dos últimos pasos era necesario colocarlo en la estufa a 60°C un máximo de 2 horas para facilitar la penetración de la resina. Después del último paso se dejaba en la estufa durante 48 horas para que la resina se polimerizara.

7.3.OBTENCION DE LOS CORTES SEMIFINOS PARA EL ESTUDIO HISTOLOGICO

Los cortes semifinos (1 μ m) se obtuvieron con un Piramitom Reichert TM60 y se tiñeron con azul de metileno y bórax, ambos al 0,5%, durante 40 minutos. Seguidamente se lavaron con agua y se observaron al microscopio óptico para efectuar el estudio histológico.

7.4. OBTENCION DE LOS CORTES ULTRAFINOS PARA SU ESTUDIO EN EL MICROSCOPIO ELECTRONICO

Los cortes semifinos que habíamos obtenido se repiramidan escogiendo la zona más adecuada. Los cortes ultrafinos de 200 a 400 Å se preparan con un ultramicrotomo Reichert Ultracut con cuchilla de diamante.

Los cortes obtenidos se colocan en rejillas de 200 Mesh y se contrastan con acetato de uranilo al 2% en agua o alcohol durante 30 minutos. Luego la muestra se lava cuidadosamente y se contrasta con citrato de plomo. Así, ya queda lista para ser observada al microscopio electrónico de transmisión. El aparato utilizado era un Phillips EM 200.

7.5. ANALISIS MORFOMETRICO

La cuantificación de los orgánulos celulares nos proporciona valores absolutos que nos permiten conocer mucho más acerca de las estructuras que nos interesan. Los cambios en el contenido de orgánulos intracelulares, que pueden inducirse por procedimientos experimentales o por procesos biológicos, pueden estudiarse observando las proporciones de una estructura de interés dentro de una célula o un tejido.

En este análisis estudiamos la relación que existe entre las dimensiones de ciertos orgánulos y la síntesis de cardenólidos, para los 8 tratamientos ensayados.

7.5.1. CONCEPTO DE ESTEREOLOGIA

La estereología puede definirse como la ciencia que permite obtener una información tridimensional de las estructuras a partir de sólo dos dimensiones.

La estereología se puede utilizar para el estudio de estructuras independientemente de su tamaño o composición. Las mismas fórmulas y técnicas de estereología se pueden aplicar a muestras geológicas y biológicas. La cuantificación en general, y particularmente la estereológica, facilita comparar distintas muestras y ver si existen diferencias reales entre ellas.

Hay numerosos trabajos y revistas que ilustran ampliamente el poder y aplicabilidad de la estereología (Underwood, 1968, 1970; Elias y col, 1971; Weibel y Bolender, 1973), que se ha convertido en una de las técnicas analíticas más útiles en el campo de la Biología celular.

TABLA M-4

Parámetros utilizados en Estereología

<u>Símbolo</u>	<u>Dimensiones</u> (en μm)	<u>Definición</u>
P	-	Número de puntos del test
P_T	-	Nº puntos sobre la estructura/ Nº de puntos del test
P_L	μm^{-1}	Nº de puntos de intersección por unidad de longitud de la línea test
P_A	μm^{-2}	Nº puntos por unidad de área test
P_V	μm^{-3}	Nº puntos por unidad de volumen test
L	μm	Longitud línea test
L_L	$\mu\text{m}\mu\text{m}^{-1}$	Fracción lineal
L_A	$\mu\text{m}\mu\text{m}^{-2}$	Longitud elementos por unidad de área test
L_V	$\mu\text{m}\mu\text{m}^{-3}$	Longitud elementos por unidad de volumen test
A	μm^2	Area test
S	μm^2	Area superficie
A_A	$\mu\text{m}^2\mu\text{m}^{-2}$	Fracción de área
S_V	$\mu\text{m}^2\mu\text{m}^{-3}$	Area superficie por unidad de volumen test
V	μm^3	Volumen
V_V	$\mu\text{m}^3\mu\text{m}^{-3}$	Fracción de volumen
N	-	Nº de estructuras de interés
N_L	μm^{-1}	Nº de intersecciones de las estructuras por unidad de longitud de la línea test
N_A	μm^{-2}	Nº de intersecciones de las estructuras por unidad de área test
N_V	μm^{-3}	Nº de estructuras por unidad de volumen test

Una intersección tiene lugar cuando el perfil de una estructura cruza por una línea test de una rejilla estereológica. La intersección se define como la longitud de una línea recta distribuida al azar que entra dentro de los límites de una partícula.

En la práctica, los análisis estereológicos se desarrollan en varias etapas. Primero se obtienen secciones representativas y adecuadas del tejido. Después se superponen las rejillas test sobre las fotografías, microfotografías o imágenes proyectadas de esas secciones. Cada rejilla test consiste en una lámina de plástico transparente que lleva un patrón de líneas o puntos. La etapa final del análisis se basa en registrar las interacciones entre la rejilla y las microfotografías de las secciones.

Esto puede hacerse contando la proporción de puntos en la rejilla que coinciden con una estructura de interés o contando el número de intersecciones que hay en los perfiles de superficie de una estructura de interés con una rejilla formada por líneas rectas. El tipo de rejilla utilizada dependerá del parámetro estereológico particular que deba determinarse.

Una lista de los parámetros estereológicos comunmente utilizados para cuantificar células y tejidos se observa en la Tabla M-4.

7.5.2. PRINCIPIOS ESTEREOLOGICOS

Cuando una célula o tejido tridimensionales se seccionan muy finamente y se examinan al microscopio se observan sólo perfiles bidimensionales. Las estructuras bidimensionales presentes se convierten en estructuras observables de una dimensión. Las estructuras de una dimensión son reducidas a puntos de cero dimensiones.

Como regla puede decirse que la incidencia de una estructura n -dimensional es observada en una sección como una estructura $(n-1)$ -dimensional. Con esta sencilla regla de "reducción dimensional" muchas estructuras pueden ser exactamente identificadas a partir de secciones. Por ejemplo, el volumen tridimensional ocupado por un núcleo se vuelve visible como un área de dos dimensiones, y una estructura bidimensional seccionada al azar aparece en una dimensión como una línea.

La reconstrucción numérica de la estructura celular por el análisis estereológico se desarrolla exactamente al contrario que la regla de la "reducción dimensional". Los datos recogidos en una dimensión son utilizados como pronóstico de las propiedades bidimensionales de las estructuras. Los datos bidimensionales, por ejemplo cálculos del área de los perfiles nucleares, se utilizan para conseguir datos tridimensionales sobre las fracciones de volumen de dichos núcleos.

7.5.3. MEDICIONES

Para efectuar estas medidas se utiliza una rejilla test que se compone de un patrón regular de puntos colocados ordenadamente sobre una superficie. También se puede utilizar una rejilla de líneas horizontales y verticales equidistantes; en este caso las intersecciones entre las líneas se utilizan como puntos.

MATERIAL Y METODOS

La rejilla de medición debe tener un número limitado y conocido de puntos; sus límites deben estar incluidos dentro de los límites del tejido durante la medición.

Consideremos por ejemplo una estructura de interés como el núcleo celular. La rejilla se coloca al azar sobre una microfotografía de la sección a estudiar y se anota el número de puntos que caen dentro del núcleo. Esto se puede repetir varias veces colocando la rejilla al azar sobre la microfotografía y contando cada vez los puntos sobre el núcleo. El número total de puntos que caen sobre el núcleo dividido por el número de puntos que posee la rejilla da la fracción de puntos para el núcleo estudiado (Weibel y col, 1966; Weibel, 1969).

Si la rejilla consta de puntos colocados ordenadamente sobre una superficie, podemos saber la distancia entre los puntos de la rejilla y el aumento de la microfotografía, y por consiguiente podemos conocer los tamaños absolutos de las estructuras.

Nosotros utilizamos una rejilla formada por una lámina de plástico transparente con un patrón de líneas equidistantes cuyas intersecciones daban 2.478 puntos. Realizamos la medición sobre una serie de microfotografías pertenecientes a las secciones de los callos crecidos sobre los 8 medios de cultivo estudiados; y nos fijamos en la superficie ocupada por las vacuolas, cloroplastos y mitocondrias dentro de la célula. Además calculamos también el porcentaje de la superficie de los cloroplastos ocupada por plastoglobulos, tilacoides y almidón.

$$\text{Proporción ocupada por la vacuola} = \frac{\text{Volumen vacuolar}}{\text{Volumen celular}}$$

$$\text{Volumen del citoplasma} = \text{Vol. celular} - \text{Vol. vacuolar}$$

Realmente lo que se mide es área, pero como las preparaciones de microscopio electrónico son tan delgadas, matemáticamente el área es comparable al volumen. Sin embargo nosotros damos los datos referidos a fracciones de área y los referimos a célula en vez de a tejido.

Los aumentos de las microfotografías no tienen importancia en nuestro caso porque damos valores relativos de las estructuras medidas.

8. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se han obtenido a partir de triplicados de dos muestras individuales, con excepción de la parte de "Crecimiento" en la cual partimos del contenido de 2 cápsulas con 6 callos cada una (un total de 12 determinaciones).

Todos estos resultados están expresados como la media \pm la desviación estándar ($X \pm SD$) de los valores hallados para cada muestra.

8.1. ANALISIS DE LA VARIANZA

Se define el análisis de la varianza (ANOVA) como la técnica estadística para analizar medidas que dependen de varios efectos que operan simultáneamente, y de este modo poder decidir los que son más importantes.

Tal como hemos comentado anteriormente, en el presente trabajo comparamos el efecto de 8 medios de cultivo (AIA, AIA Gb, AIA Pb, AIA Gb Pb, ANA, ANA Gb, ANA Pb, ANA Gb Pb) a lo largo de las 6 primeras semanas de crecimiento en callos de *Digitalis purpurea* sobre las medidas de Peso fresco y Peso seco de los callos, contenido en proteínas mitocondriales y microsomales, citocromo P450 mitocondrial y microsomal, actividad NADPH citocromo P450 reductasa microsomal y del complejo enzimático responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol, producción de cardenólidos totales y producción de digitoxina.

Así, cada una de las 10 medidas estudiadas se sometió a un análisis de la varianza de dos factores (tiempo y medios de cultivo), considerando que no había interacción entre ellos. Según se aplica al análisis de la varianza, la interacción se refiere a cambios en la varianza que dependen del nivel de una de las variables controlables. En estas circunstancias, este residual se toma como evidencia de que las variables actúan entre sí para producir juntas efectos que ninguna de ellas podría producir por separado.

Primero, pues, se analizó si estos 2 factores por separado contribuían significativamente a la varianza total del análisis, es decir, se estudiaron los efectos individuales de los 8 medios de cultivo y de las 6 semanas de crecimiento para cada medida. Para ello se tomó el siguiente modelo matemático:

$$y_{ij} = u + a_1 + a_2 + a_3 + a_4 + a_5 + a_6 + b_1 + b_2 + b_3 + b_4 + b_5 + b_6 + b_7 + b_8 + e_{ij}$$

u = media general

a_i = niveles del factor tiempo

$$\sum_{i=1}^6 a_i = 0$$

b_i = niveles del factor medio

$$\sum_{i=1}^8 b_i = 0$$

MATERIAL Y METODOS

y se consideraron estos criterios:

Nº variables	1
Nº celdas	48
Diseño factorial (sin interacción entre los factores)	
Nº factores	2
Niveles del factor tiempo	6
Niveles del factor medio	8
Nº parámetros	13
Nivel de significación	0,05

En este análisis de la varianza para estudiar la significación del factor tiempo y del factor medio se consideraron las siguientes hipótesis:

$a_1 = a_2 = a_3 = a_4 = a_5 = a_6$	No hay diferencias entre semanas.
$b_1 = b_2 = b_3 = b_4 = b_5 = b_6 = b_7 = b_8$	No hay diferencias entre medios.

y resultó que para las 10 medidas analizadas se rechazó esta hipótesis nula tanto en las semanas como en los medios. Por ello ambos factores tienen un efecto significativo sobre los resultados de las medidas consideradas, es decir, hay diferencias entre las semanas de crecimiento y hay diferencias entre los medios de cultivo estudiados, para cada una de las 10 medidas.

Como en todos los casos los efectos producidos por los diferentes medios y en las diferentes semanas eran distintos estadísticamente fué preciso saber cuales diferían de los demás y si había algunos de ellos iguales entre sí.

Para ello realizamos comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni, es decir, comparamos los factores dos a dos con unos niveles de significación tales que el nivel de significación global continuara siendo 0,05.

Se obtuvo que en las comparaciones entre semanas el nivel de significación individual para cada ensayo era de $\alpha = 0,05/15 = 0,0033$, pues se habían considerado 15 hipótesis posibles; y para contrastar los medios el nivel de significación individual aplicado era de $\alpha = 0,05/28 = 0,0017$ ya que había que considerar 28 hipótesis posibles.

Estas comparaciones múltiples se efectuaron también para cada una de las 10 medidas.

Una vez aplicado el método de Bonferroni, centramos nuestra atención en los resultados obtenidos con este método en las medidas de "Producción de cardenolidos" y

"Producción de Digitoxina", observando tres igualdades en ambos casos, es decir, tres tipos de comportamiento para los medios estudiados (ver secciones III.5.1.5. y III.5.2.5.). Con estos datos realizamos otro análisis de la varianza (ANOVA) con el fin de saber cual de los tres grupos, para cada medida, era el más productivo durante las 6 semanas de cultivo.

Todos estos estudios estadísticos se realizaron con ayuda de los programas del paquete MULTICUA: Paquete no estándar de Análisis Multivariante (c) C.M.Cuadras, C.Arenas, J.Fortiana (1991). Departamento de Estadística. Universidad de Barcelona. Versión 0.76 (1/12/92).

8.2.REGRESION LINEAL MULTIPLE

Por último, relacionamos el contenido en cardenólidos totales del grupo que resultó más productivo por el análisis de la varianza, con las otras 6 medidas estudiadas (Proteínas mitocondriales y microsomales, Citocromo P450 mitocondrial y P450 microsomal, NADPH citocromo P450 reductasa y complejo responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol).

En este estudio prescindimos de las medidas referentes al crecimiento (Peso fresco y Peso seco) y al contenido en Digitoxina, ya que por una parte sabemos que la producción de cardenólidos en cultivos *in vitro* no está directamente relacionada con la producción de biomasa (Ohlsson y col,1983), y por otra parte la Digitoxina está incluida entre los cardenólidos totales.

Así se estableció la regresión lineal (mínimo cuadrática) múltiple para el grupo más productivo, en la que consideramos la influencia de las 6 variables aleatorias sobre la variable dependiente, en nuestro caso la "Producción de cardenólidos".

La regresión lineal encontrada define un hiperplano de regresión lineal de Y sobre (X_1, \dots, X_{n-1}) y se puede expresar de la manera siguiente:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 + b_6X_6 + \epsilon$$

El hiperplano encontrado es el que mejor se ajusta a la masa de distribución n-dimensional (en nuestro caso 6-dimensional) según el criterio de mínimos cuadrados. A los coeficientes b_0, b_1, \dots, b_{n-1} se les denomina coeficientes de regresión de Y sobre (X_1, \dots, X_{n-1}) .

Aquí también hallamos un coeficiente de correlación múltiple (R) que como en el caso de la regresión lineal de una variable nos da idea de la bondad del ajuste efectuado, es decir, podemos deducir según su valor si existe realmente una buena correlación entre la producción de cardenóidos en nuestros cultivos y el resto de las medidas analizadas. Cuanto más cerca de la unidad se encuentre este coeficiente de correlación al cuadrado, mayor será el ajuste.

Este estudio estadístico se llevó a cabo con el paquete MULTICUA: Paquete no estándar de Análisis Multivariante (c) C.M.Cuadras, C.Arenas, J.Fortiana (1991). Departamento de Estadística. Universidad de Barcelona. Versión 0.76 (1/12/92).

III. RESULTADOS Y DISCUSION

III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA

1.1. MORFOLOGIA EXTERNA

La formación de sustancias secundarias, como se ha comentado anteriormente, se considera como uno de los pasos de la diferenciación, ya que previamente deben haberse formado los enzimas para su síntesis y las estructuras en las que se forman o almacenan, por ello una de las causas del fracaso en el rendimiento en metabolitos secundarios en el cultivo *in vitro* de callos o células aisladas puede ser la falta de diferenciación.

Parece ser que la producción de cardenólidos *in vitro* es menor en células indiferenciadas o en células diferenciadas en raíces, en cambio las células diferenciadas en yemas de parte aérea dan más cantidad (Hagimori y col, 1982a).

Kreis y Reinhard (1987) constataron la acumulación de cardenólidos en las vacuolas de las células procedentes de cultivos celulares de *Digitalis lanata*. La morfogénesis en cultivos celulares establecida a partir de diferentes tejidos de *Digitalis lanata* ha sido estudiada por Diettrich y col. (1986) aunque sin compararla con la acumulación de cardenólidos, pero otros muchos autores (Büchner y Staba, 1964; Pilgrim, 1972; Kartnig, 1977) afirmaron que en ausencia de morfogénesis no se daba la síntesis de cardenólidos; además, Hirotsani y Furuya (1977) observaron que la manifestación de la potencial síntesis de cardenólidos en callos de *Digitalis purpurea* parece estar estrechamente relacionada con la formación de estructuras similares a hojas. En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio se constató que bastaba la diferenciación a nivel celular para hacer posible la síntesis de estas sustancias.

En este trabajo estudiamos la morfología externa de los callos de *Digitalis purpurea* crecidos en 8 medios de cultivo, su histología y ultraestructura, intentando relacionarlas con la producción de cardenólidos.

Medios de cultivo

Medio AIA: Los callos crecidos en el medio de cultivo AIA son claros y friables al principio del experimento, oscureciéndose a lo largo del mismo. A partir de la 4^a semana de crecimiento aparecen algunas zonas de parénquima fotosintético. Es destacable la abundante formación de yemas incipientes de raíz y parte aérea que se observa a partir de la 2^a semana de crecimiento.

Medio AIA Gb: La adición de Giberelina al medio suplementado con AIA produce en general un aumento en el tamaño de los callos pero no varía su textura. Sin embargo, en este medio, aunque se observan algunas zonas fotosintéticas a partir de las tercera semana del experimento, la diferenciación visible es escasa.

Medio AIA Pb: Los callos crecidos en el medio de cultivo AIA Pb presentan menor tamaño durante todo el experimento, siendo al principio callos friables y claros, que se van haciendo más compactos y con zonas necróticas a partir de la 2^a semana de crecimiento. No forman parénquima fotosintético, pero presentan bastante diferenciación formando algunas yemas de parte aérea y abundantes raíces, que en algunos casos muestran gran longitud.

Medio AIA Gb Pb: La adición conjunta de Gb y Pb al medio de cultivo AIA da lugar a la formación de callos grandes y friables que presentan mayor grado de necrosación que los crecidos sobre AIA Gb. Al igual que los crecidos sobre AIA Pb, presentan pocas zonas fotosintéticas, sin embargo a partir de la 2^a semana de crecimiento se forman abundantes yemas de parte aérea y muchas raíces.

Medio ANA: Los callos crecidos sobre medio ANA son grandes durante toda la experiencia. Al principio son friables y de color claro, adquiriendo después aspecto grumoso y coloración más oscura. Es de destacar la escasa diferenciación visible que presentan estos callos a lo largo de su ciclo de crecimiento.

Medio ANA Gb: La adición de Giberelina al medio de cultivo ANA provoca un mayor tamaño de los callos, pero su color y textura no varían. Se observa un ligero aumento en el grado de diferenciación respecto al medio ANA, y favorece la formación de parénquima fotosintético a partir de la 3^a semana de crecimiento.

Medio ANA Pb: Los callos crecidos en medio ANA Pb, aunque al principio son claros y friables, ya en la 2^a semana presentan zonas necrosadas. Es destacable el alto grado de diferenciación en yemas incipientes de raíz que presentan especialmente las zonas algo necrosadas. En general tienen menor tamaño.

Medio ANA Gb Pb: La adición de Gb y Pb al medio de cultivo ANA da lugar a la formación de callos grandes y retrasa la necrosación de los mismos hasta la 4^a semana de crecimiento. Los callos crecidos en este medio, aunque poseen pocas zonas fotosintéticas presentan un alto grado de diferenciación en forma de yemas de raíz observables ya a partir de la 1^a semana de crecimiento.

Discusión

Como consecuencia de lo expuesto podríamos decir que la Gb añadida a un medio con la auxina AIA da como resultado células mayores, e inhibe aproximadamente en un 50% la diferenciación; también parece dificultar la formación de parénquima fotosintético. En resumen, mantiene el estado juvenil de los callos.

Por el contrario, la adición de Pb al medio AIA reduce considerablemente el tamaño de las células, y a pesar de la baja dosis aplicada induce una necrosis incipiente ya en la 2ª semana de crecimiento; en cuanto a la organogénesis podemos advertir que en la 1ª semana cuando no hay indicios de necrosis se inicia ya una cierta diferenciación que queda disminuída, especialmente en yemas de parte aérea, con respecto a los cultivos AIA, debido sin duda a la necrosis existente en los tejidos.

Al añadir simultáneamente Gb y Pb se obtienen callos grandes, con mayor necrosación que en AIA Gb y abundante diferenciación a partir de la cuarta semana de crecimiento, por tanto podríamos decir que en las primeras semanas de crecimiento prevalece la acción de la Gb y a partir de la cuarta semana el efecto del Pb parece tener mayor influencia.

Los callos crecidos en el medio ANA son los que presentan menor grado de diferenciación a lo largo de todo el crecimiento. La adición de Gb a dicho medio produce células mayores y aumenta ligeramente la diferenciación, lo cual demuestra que la acción de la Gb sobre la diferenciación depende de su interacción con la auxina del medio. Por el contrario, la adición de Pb da lugar a callos de menor tamaño e induce una rápida necrosación ya a partir de la 2ª semana, mientras que tiene una influencia positiva sobre la diferenciación, que se inicia ya en la 1ª semana y se hace máxima en el curso del experimento.

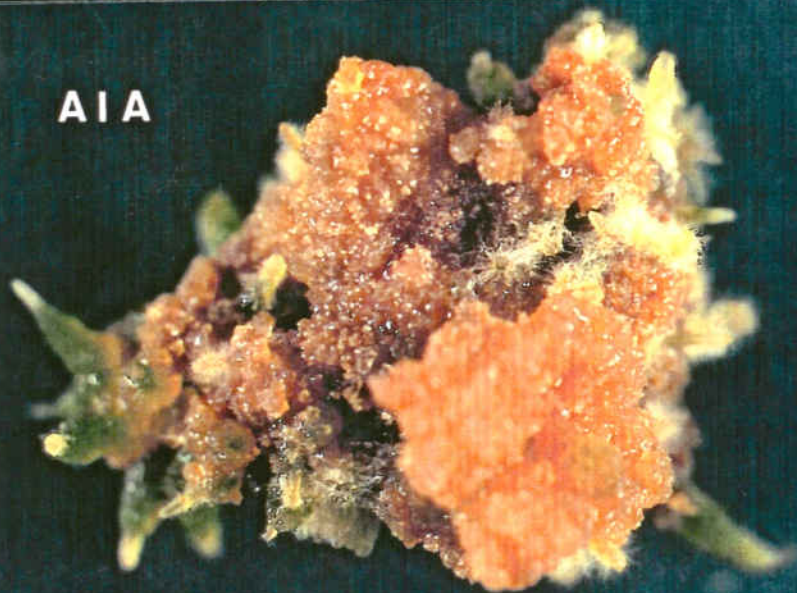
La adición simultánea de Gb y Pb produce la formación de callos grandes con lo cual debemos pensar que la Gb, como en el caso del AIA Gb Pb, tiene una mayor influencia que el Pb durante las primeras semanas de crecimiento ya que los callos se necrosan a partir de la 4ª semana, por lo cual, en esto, la Gb inhibe en parte el efecto del Pb. En cuanto a la diferenciación, alta desde la primera semana, en la primera mitad del experimento es superior a la de los callos adicionados únicamente con Pb. Debemos pensar que el retardo de la necrosis inducida por la Gb hace posible que el Pb actúe sobre células vivas activando en mayor grado su diferenciación.

En la Tabla R-1 se puede observar el índice de organogénesis encontrado en cada medio y en la Figura R-1 se muestra un cuadro que resume las características principales de los callos en cada medio de cultivo. En las Figuras R-2, R-3 y R-4 puede verse un aspecto poco usual de diversos callos en algunos de los medios estudiados.

C₂



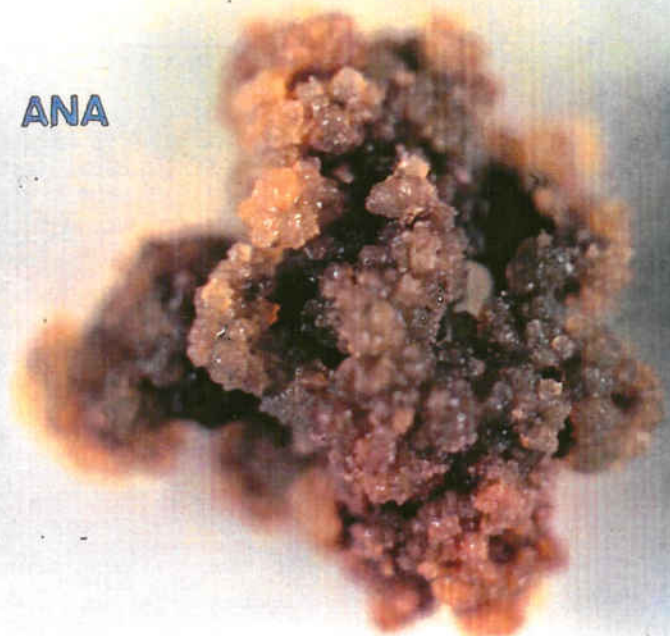
AIA



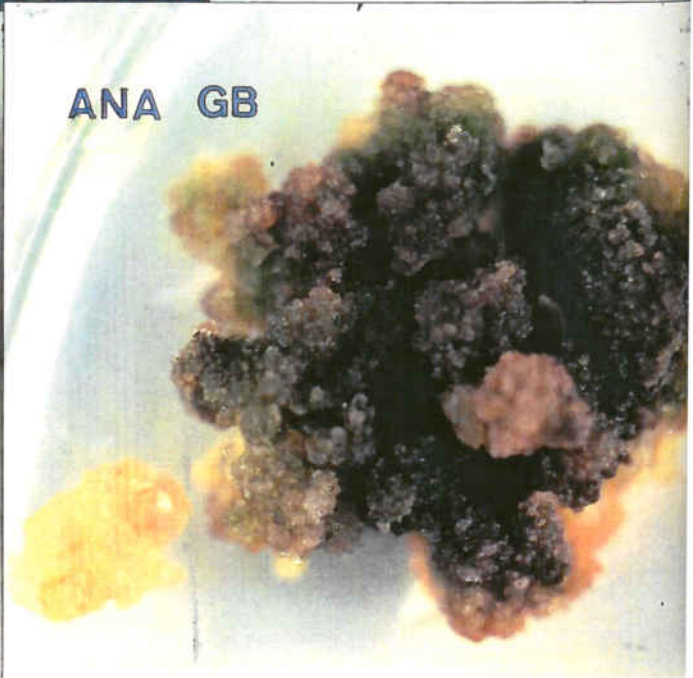
AIA GB



ANA

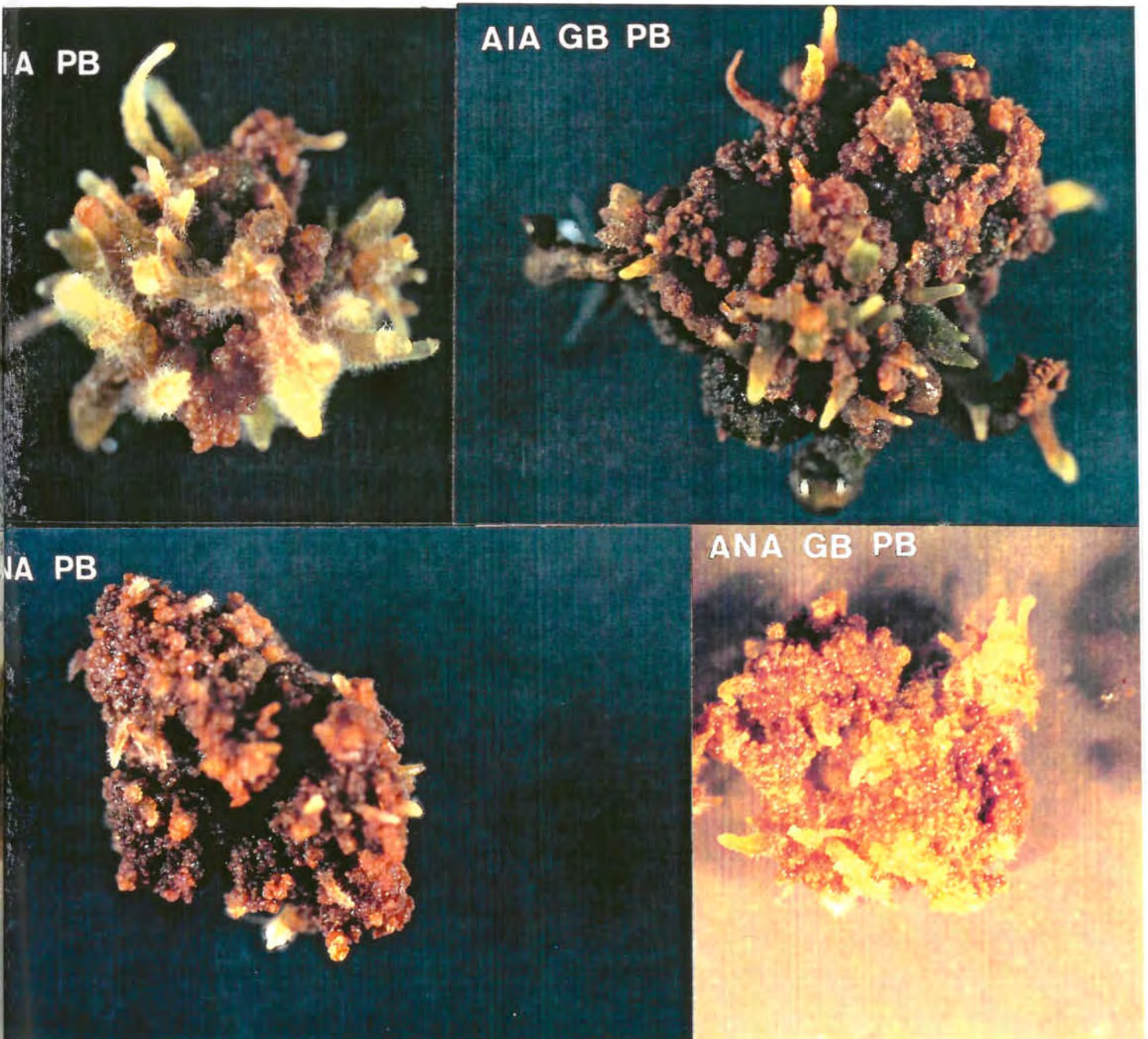


ANA GB



RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-1: Morfología de los callos a las 4 semanas de crecimiento en cada uno de los 8 medios de cultivo estudiados. El callo crecido en el medio C₂ pertenece a la línea de cultivo utilizada como base en este estudio.



RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-1: INDICE DE ORGANOGENESIS (%)

T*	MEDIOS							
	AIA	AIAGb	AIAPb	AIAGbPb	ANA	ANAGb	ANAPb	ANAGbPb
1 ^a -	0	0	15	16	0	0	28	25
2 ^a -	25	8	18	60	0	18	60	80
3 ^a -	30	16	30	75	10	25	72	80
4 ^a -	70	16	50	90	12	30	100	100
5 ^a -	75	35	65	100	25	33	100	100
6 ^a -	90	50	70	100	30	45	100	100

*T = Tiempo en semanas

$$I.O. = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ callos con organogénesis}}{\text{N}^{\circ} \text{ callos totales}}$$

I.O. = Indice de organogénesis

FIGURA R-2

Aspecto de dos callos crecidos en el medio AIA Gb en los que se observa diferenciación.



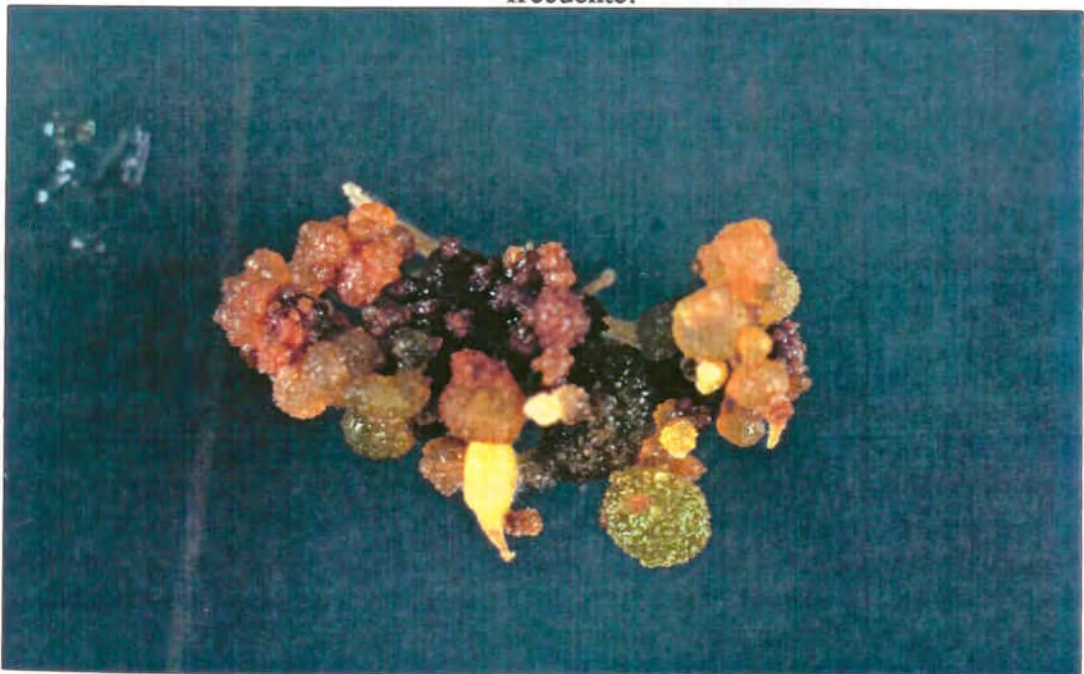
FIGURA R-3

Aspecto de un callo en el medio ANA Gb en la sexta semana de crecimiento.



FIGURA R-4

Aspecto de un callo crecido en el medio ANA Gb Pb con organogénesis poco frecuente.



1.2. ESTUDIO HISTOLOGICO

Medios AIA

Los callos crecidos en el medio AIA presentan un parénquima compacto con alguna célula conductora. En la Figura R-5 se observa un tejido parenquimático adulto.

Cuando adicionamos Gb se observa un visible aumento del tamaño de las células formando un parénquima adulto muy compacto sin diferenciación visible, y en el que no hemos encontrado áreas meristemáticas (Figura R-6). Por el contrario los callos crecidos en Pb sí poseen zonas jóvenes rodeadas de tejido adulto compacto y de tejido conductor. Los espacios intercelulares son casi inexistentes (Figura R-7).

Al adicionar conjuntamente Gb y Pb se observa una gran proporción de tejido meristemático rodeado de células adultas, existen también muy escasos espacios intercelulares al mismo tiempo que una gran formación de yemas especialmente de raíz ya que podemos observar (Figura R-8) la estructura típica de meristemo en el centro con algunas células conductoras (traqueidas) caracterizadas por su pared más gruesa, y una epidermis que lo rodea algo suberificada. Esta estructura es muy similar al corte de una raíz. En la Figura R-9 se aprecia la formación de un embriode.

Medios ANA

En los callos crecidos en el medio ANA se observa un tejido parenquimático adulto con espacios intercelulares por lo cual el tejido es más esponjoso. En la Figura R-10 puede observarse un tejido parenquimático adulto sin células conductoras.

Si el callo ha crecido en Gb sus células son de mayor tamaño que las anteriores, el tejido es más compacto también que en el caso anterior y está constituido prácticamente por células adultas y tejido conductor, ya que no hemos encontrado áreas meristemáticas; la Figura R-11 muestra un tejido parenquimático con una posible célula conductora ya que posee la pared muy engrosada. En cambio los crecidos en Pb tienen grandes núcleos meristemáticos rodeados de células adultas y conductoras; en las células meristemáticas se ven perfectamente el núcleo y el nucleolo y alguna célula conductora a su alrededor. El tejido es poco vacuolado y parece formar embrioides (Figura R-12).

La acción simultánea del Gb y Pb da un tejido parenquimático con pequeños espacios intercelulares lo cual indica que procede directamente de células meristemáticas, y efectivamente se observan gran número de meristemos rodeados de células adultas; el hecho de que no se observen núcleos meristemáticos se debe al envejecimiento del tejido. Los núcleos oscuros corresponden a zonas con polifenoles que representan puntos de necrosación (Figura R-13).

Discusión

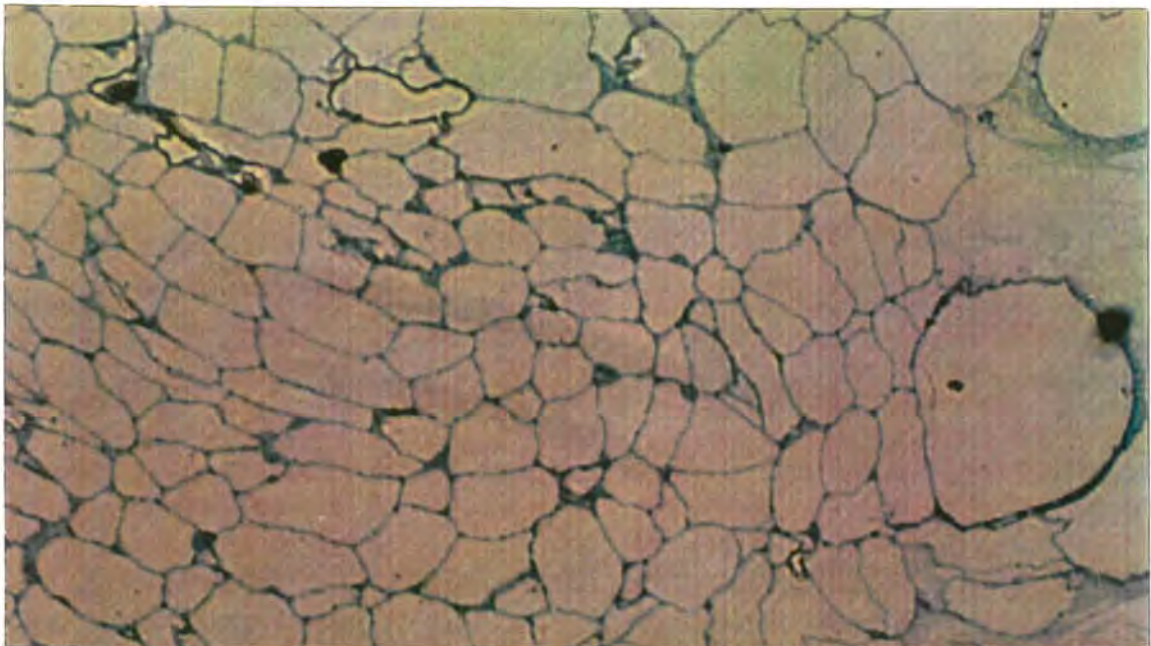
En general podemos decir que la auxina sintética ANA origina en el tejido espacios intercelulares mayores que la auxina natural AIA. La adición de Gb, en ambos medios, hace que las células sean de mayor tamaño y reduce los espacios intercelulares; también retrasa la diferenciación de los tejidos e induce el alargamiento celular, estos hechos ya habían sido observados con anterioridad por Kato (1955), Paleg y Hyde (1964), Borchert (1965) y Solsona (1992).

La adición de Pb en las cantidades utilizadas en este trabajo provoca una mayor formación de áreas meristemáticas y también parece desarrollar el tejido conductor, mientras que a dosis superiores se encontró que inhibía la división celular y como consecuencia la formación de meristemos (Solsona,1992).

La Gb y el Pb añadidos simultáneamente producen gran formación de yemas y tejido meristemático, así pues, diríamos que la Gb parece potenciar la acción del Pb dando lugar a la formación de meristemos.

FIGURA R-5

Histología de los callos crecidos en el medio
AIA a las 6 semanas de crecimiento.



RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-6

Histología de los callos crecidos en el medio
AIA Gb a las 6 semanas de crecimiento.

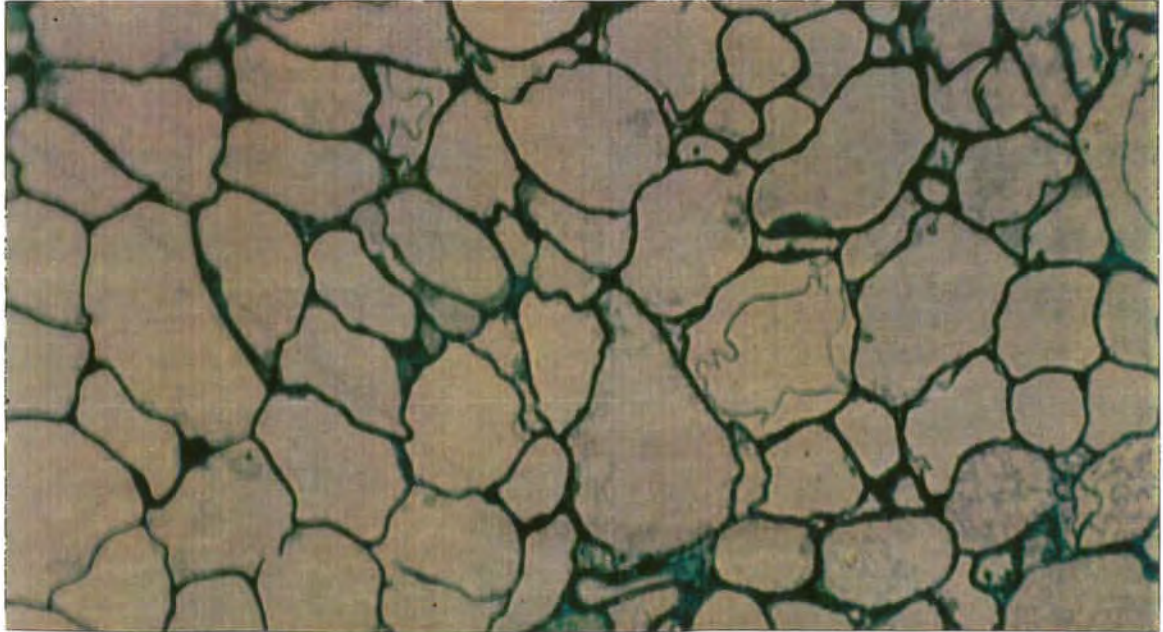


FIGURA R-7

Histología de los callos crecidos en el medio
AIA Pb a las 6 semanas de crecimiento.

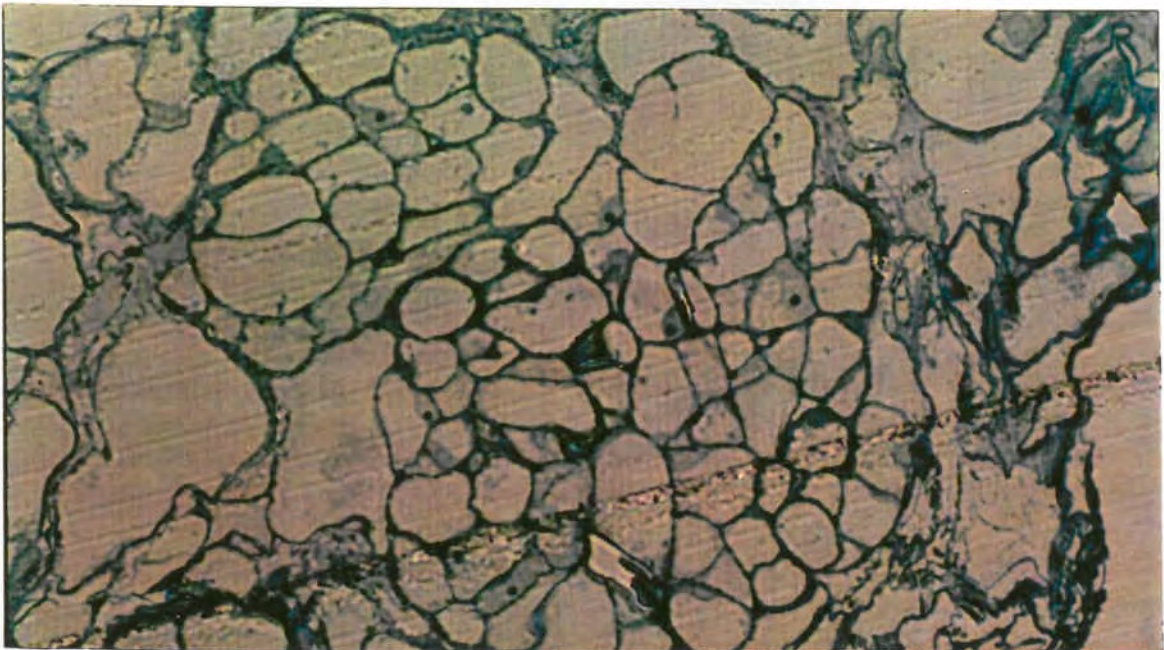


FIGURA R-8

Histología de los callos crecidos en el medio AIA Gb Pb a las 6 semanas de crecimiento.

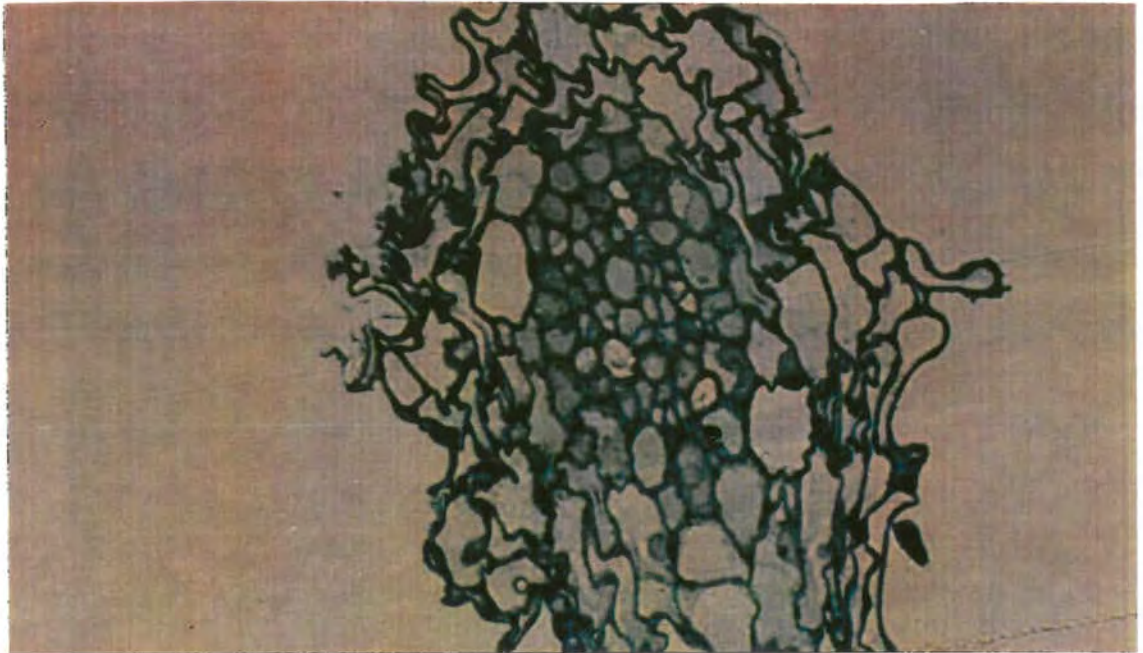
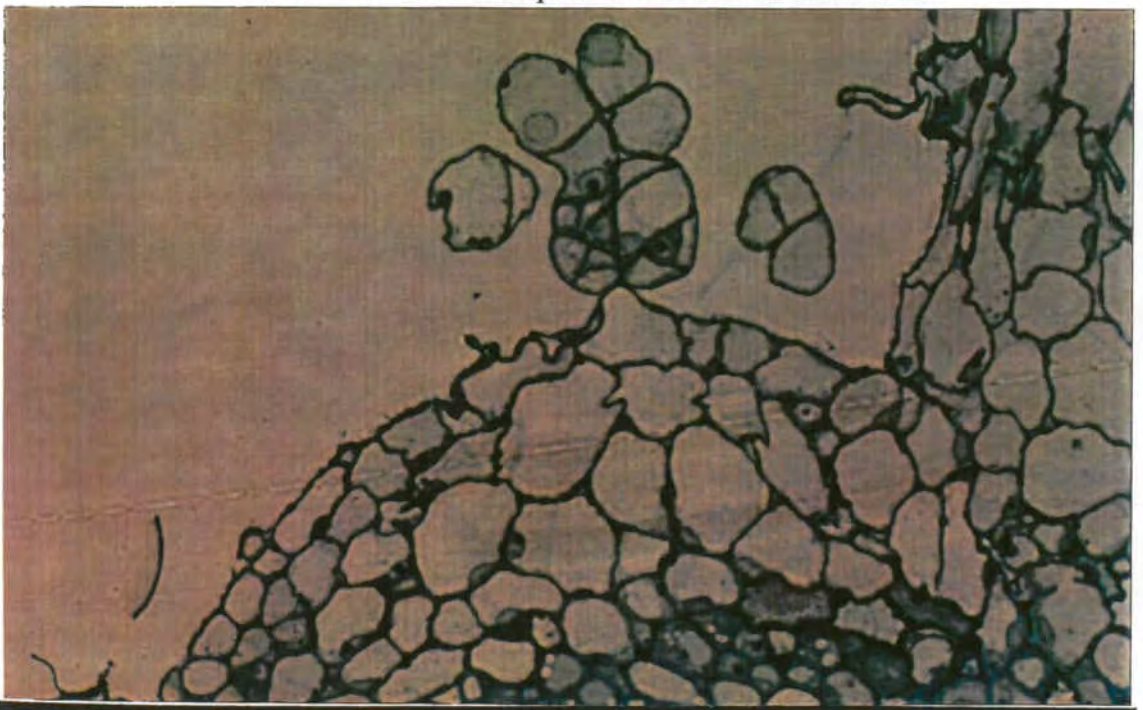


FIGURA R-9

Formación de un embriode en callos crecidos en el medio AIA Gb Pb después de 6 semanas de cultivo.



RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-10

Histología de los callos crecidos en el medio
ANA a las 6 semanas de crecimiento.

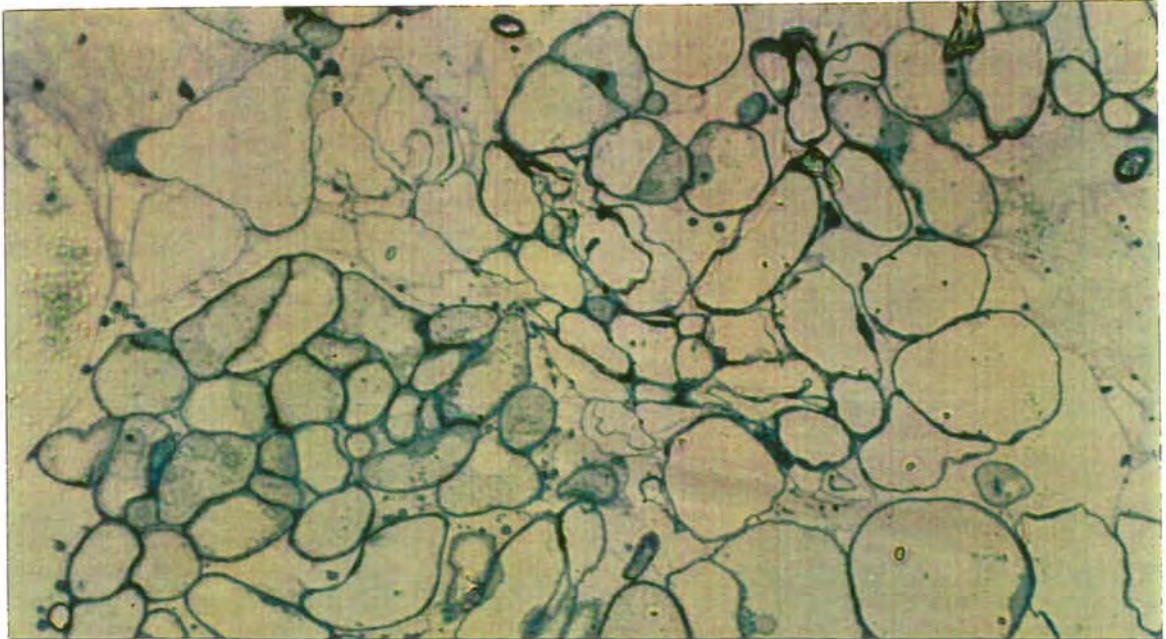
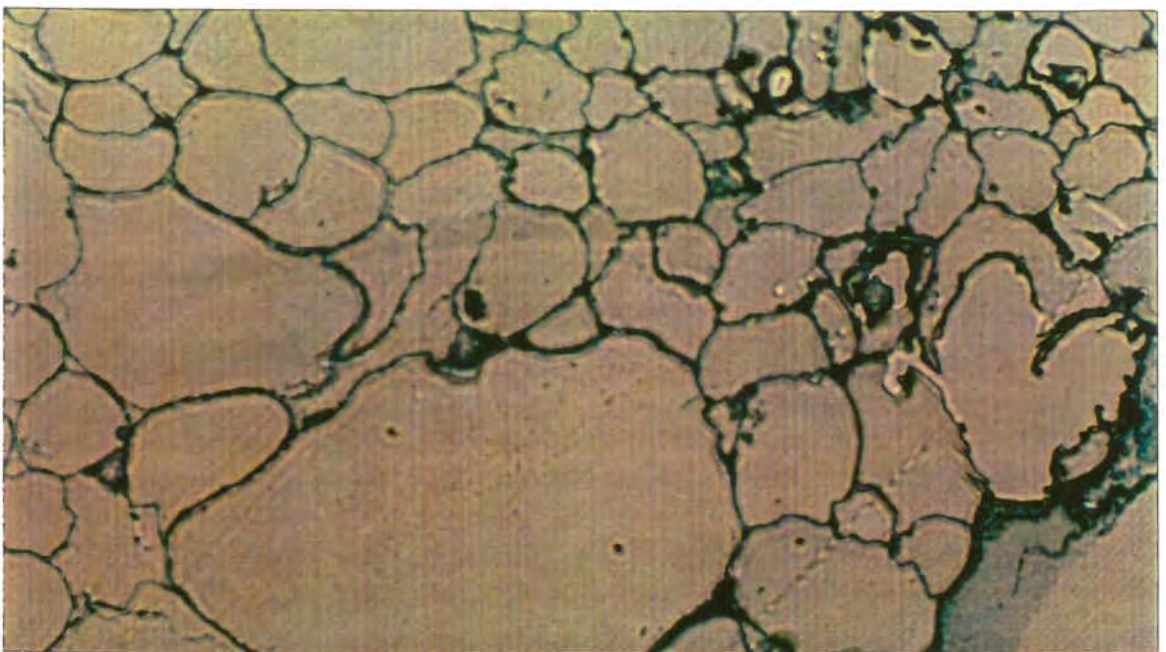


FIGURA R-11

Histología de los callos crecidos en el medio
ANA Gb a las 6 semanas de crecimiento.



RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-12

Histología de los callos crecidos en el medio
ANA Pb a las 6 semanas de crecimiento.

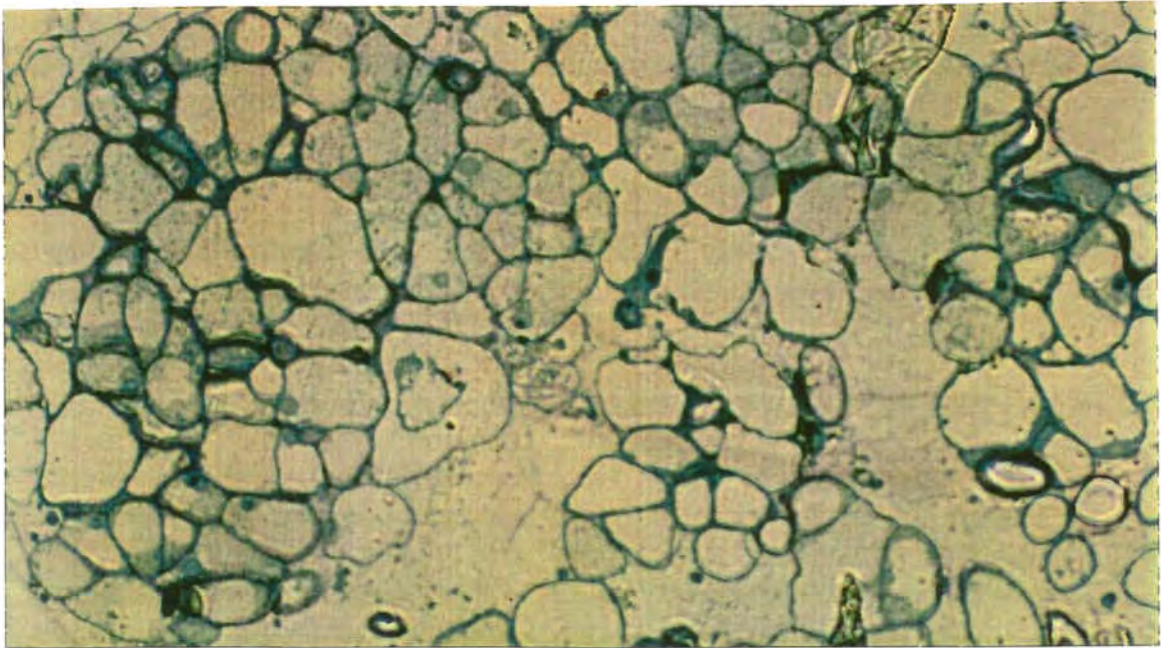
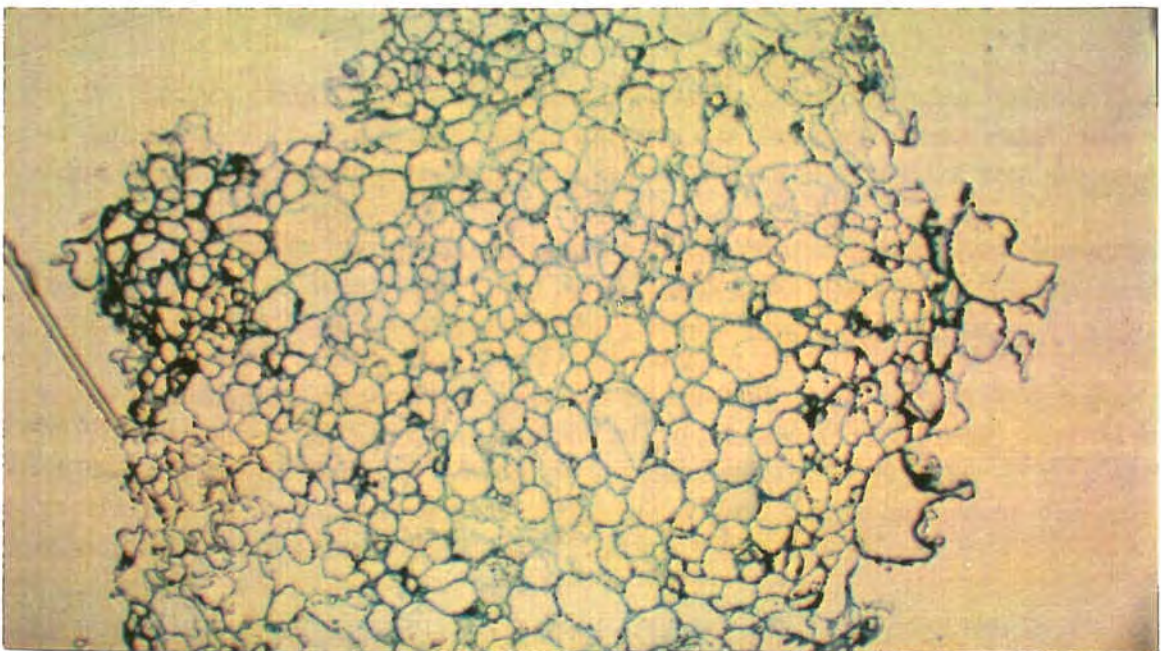


FIGURA R-13

Histología de los callos crecidos en el medio
ANA Gb Pb a las 6 semanas de crecimiento.



1.3. ESTUDIO DE LA ULTRAESTRUCTURA

Berggren y Ohlsson (1991) realizaron un estudio de la ultraestructura de células de *Digitalis lanata* obtenidas en cultivo de tejidos atendiendo a la relación entre producción de cardenólidos y orgánulos celulares. Observaron que las células que acumulaban más cardenólidos poseían mayor cantidad de plastidios y retículo endoplasmático; además parecía que la cantidad de mitocondrias no guarda relación directa con la producción de cardenólidos al igual que ocurre con el contenido en almidón.

Estas conclusiones contrastan con las halladas por Solsona (1992) que encontró relación positiva entre el número de mitocondrias, la actividad del complejo enzimático responsable de la rotura de la cadena lateral del colesterol y los niveles de cardenólidos. Sin embargo Solsona trabajaba con tejido estresado debido a la gran cantidad de Fenobarbital añadido al medio.

En cuanto a la relación n° plastidios/cardenólidos Hagimori y col.(1982a) llegaron a la conclusión de que los cloroplastos fotosintéticamente activos no eran esenciales para la síntesis de digitoxina en *Digitalis purpurea*, aunque sí podían serlo los proplastidios pues seguramente contenían el sistema biosintético de los cardenólidos. Además especularon que cuando las células se diferencian para formar yemas, el sistema en el proplastidio se expresa indiferentemente de las condiciones de luz. Ohlsson y col.(1983) también observaron que hay relación entre el contenido en clorofila y el contenido en digitoxina (no ocurre igual con la digoxina), en cultivos celulares de *Digitalis lanata*, y que la cantidad de clorofila podía ser un parámetro para sondear qué tipos de células son productoras de cardenólidos. Sin embargo, ellos mismos concluyeron que para la producción de cardenólidos es más importante la diferenciación que la formación de clorofila y cloroplastos. Por otra parte, Scheibner y col.(1987) indicaron que en embriones con cloroplastos de especies de *Digitalis* no había relación directa entre cantidad de cardenólidos y clorofila a pesar de que poseían más cantidad de cardenólidos.

Ohlsson (1990) comprobó que el ABA y la Gb disminuían la acumulación de clorofila en cultivos celulares de *Digitalis lanata* crecidos a la luz, el efecto era mucho mayor con el ABA. También se observaba diferenciación morfológica al añadir Gb pero no con el ABA.

Otros autores han encontrado que las citoquininas aumentan los componentes de las membranas cloroplásticas, tales como carotenoides y clorofilas; concretamente la quinina acelera el desarrollo de los plastidios (Paul y Gupta 1988).

Por ello en el presente trabajo hemos estudiado la ultraestructura de los callos crecidos en 8 medios de cultivo distintos después de cuatro semanas de crecimiento, período favorable ya que a partir de entonces muchos de los callos presentan síntomas de necrosación. La experiencia ha demostrado que el último período de cultivo no parece dar diferencias significativas en los contenidos de cardenólidos.

Consideraciones generales para cada medio:

Medio AIA: Las células poseen cloroplastos con plastoglobulos, pocas lamelas y escasa cantidad de almidón (Figura R-14).

Medio AIA Gb: Células con cloroplastos grandes, las lamelas están bien formadas, poseen plastoglobulos y granos de almidón abundantes. Existe gran riqueza en mitocondrias y microcuerpos (Figura R-15). La Figura R-16 presenta algunos proplastidios.

Medio AIA Pb: Los cloroplastos poseen abundantes plastoglobulos y lamelas, no se observa almidón (Figuras R-17 y R-18). Se encuentra gran riqueza en retículo endoplasmático, mitocondrias y microcuerpos. También podemos observar (Figura R-19) "cuerpos mielínicos" que son indicio de diferenciación del tejido o de muerte celular. Se aprecian además numerosas membranas vacuolares que engloban citoplasma, y mitocondrias que han perdido sus crestas y se vacuolizan y esto es un síntoma de estrés según observaron Vartapetian y Zakhmilova (1990).

Medio AIA Gb Pb: Las células poseen cloroplastos algo desorganizados con plastoglobulos y gran cantidad de plastidios ameboides que son síntoma de un rápido desarrollo, según Huang y van Steveninck (1990). El retículo endoplasmático está en gran cantidad con muchas vesículas y microcuerpos, el número de mitocondrias es también abundante. Podemos ver también numerosas vacuolas (membranas vacuolares) que engloban citoplasma (Figuras R-20 y R-21).

Medio ANA: Las células poseen gran riqueza en sistema vacuolar y abundantes mitocondrias y microcuerpos. Los cloroplastos tienen las lamelas bien formadas y algunos plastoglobulos. El almidón es escaso. Se observan membranas vacuolares que encierran citoplasma (Figura R-22).

Medio ANA Gb: Los cloroplastos poseen, en general, forma redondeada y algunos plastoglobulos, apenas se observa almidón. El retículo endoplasmático, las mitocondrias y microcuerpos son abundantes, se observan proplastidios de gran tamaño que como ya hemos comentado en AIA Gb Pb son síntoma de un rápido crecimiento (Figura R-23). Se observan también dictiosomas cuya actividad está acelerada por efecto de la Giberelina; cerca de los dictiosomas pueden verse gran cantidad de provacuolas que normalmente son el origen de vacuolas que engloban citoplasma según Davies y col. (1992) (Figura R-24).

Medio ANA Pb: Los cloroplastos aparecen disgregados, sin almidón, con formas ameboides (Figura R-25). El retículo endoplasmático es visible y activo; en el citoplasma existe una gran cantidad de mitocondrias y microcuerpos; también hay "cuerpos mielínicos" que son signo de degradación o de diferenciación, como ya hemos mencionado anteriormente (Figura R-26).

Medio ANA Gb Pb: Los cloroplastos poseen granos de almidón muy grandes. Se observa una gran riqueza en mitocondrias y retículo endoplasmático así como una gran abundancia de aparato vacuolar que sin duda formará vacuolas que envuelven citoplasma (Figura R-27).

Comparaciones entre los medios :

Medios AIA-ANA: El tamaño de las células es superior en el medio ANA y se observa en este medio gran riqueza en sistema vacuolar, también posee mayor cantidad de mitocondrias y microcuerpos.

Medios AIA Gb-ANA Gb: En ambos medios es parecida la actividad del retículo endoplasmático, con abundantes dictiosomas cuya función aparece acelerada por efecto de la giberelina; también es similar la cantidad de mitocondrias y microcuerpos. Hay mayor cantidad de proplastidios en ANA Gb; se observa también que en AIA Gb cuando son pequeños son muy alargados y con las lamelas bien formadas, pero luego se redondean, toman agua y quedan las lamelas en un extremo. Es de destacar la gran cantidad de almidón que poseen los cloroplastos del medio AIA Gb, mientras que en ANA Gb es muy escaso.

Medios AIA Pb-ANA Pb: En ambos medios el retículo endoplasmático está muy desarrollado. El medio AIA Pb es quizás más rico en mitocondrias y microcuerpos que el ANA Pb. Los cloroplastos están desorganizados y existen numerosos proplastidios y cuerpos mielínicos que demuestran degradación o diferenciación en ambos medios.

Medios AIA Gb Pb-ANA Gb Pb: Ambos medios dan un citoplasma rico en retículo endoplasmático, mitocondrias y microcuerpos. Los cloroplastos adultos aparecen hinchados y las lamelas quedan en uno de los extremos.

Análisis morfométrico

Se realizó un análisis morfométrico sobre las fotografías del microscopio electrónico para averiguar las fracciones de área vacuolar , mitocondrial y cloroplástica respecto al área de las células; así como los porcentajes del área de plastoglobulos, tilacoides y almidón en relación al área de los cloroplastos (Weibel, 1969).

En la Tabla R-2 se recogen los resultados de este análisis, en ella podemos observar que la Giberelina aumenta en todos los casos el volumen vacuolar y el volumen de los cloroplastos con respecto a las células, mientras que el Fenobarbital disminuye este volumen cloroplástico. Por el contrario, el volumen de las mitocondrias con respecto a las células queda aumentado por la Giberelina y en mucho mayor grado por el Fenobarbital.

RESULTADOS Y DISCUSION

En cuanto a las estructuras observadas en los cloroplastos la Giberelina no influye de manera clara sobre el volumen de los plastoglóbulos respecto a los cloroplastos, mientras que el Fenobarbital aumenta el volumen de los plastoglóbulos con respecto al volumen de los cloroplastos.

La Giberelina, aunque provoca a veces la formación de cloroplastos vacuolados, en general aumenta el volumen de las lamelas respecto al cloroplasto mientras que el Fenobarbital lo disminuye.

Sobre el almidón no hay un efecto claro de la Giberelina y el Fenobarbital en los cloroplastos.

Como resumen de todo lo expuesto podemos anotar, en términos generales, las siguientes secuencias:

CELULAS

Tamaño de las células:

ANAGb-ANAGbPb-AIAGb > ANA > AIAPb-ANAPb > AIA > AIAGbPb

Células vacuoladas:

AIAGb > ANA-ANAGb-ANAGbPb > AIAGbPb > ANAPb > AIA > AIAPb

CLOROPLASTOS

Cantidad de cloroplastos:

AIA-AIAGb > AIAPb-AIAGbPb > ANAGbPb > ANAGb-ANA > ANAPb

Cloroplastos desorganizados:

ANAPb > ANAGb > ANAGbPb-ANA > AIAPb > AIAGbPb > AIA > AIA Gb

Cloroplastos vacuolados:

AIAGb > AIA > AIAGbPb > ANAGb-ANAPb > ANA > ANAGbPb-AIAPb

Plastoglóbulos:

AIAPb-AIAGbPb > AIAGb-AIA > ANAPb > ANAGbPb > ANA-ANAGb

Tilacoides:

AIAPb > AIAGb > ANAGbPb > AIA-AIAGbPb > ANAGb > ANA-ANAPb

Granos de almidón:

ANAGbPb - AIAGb > AIA - ANA - ANAGb.

No se observan en los restantes medios.

MITOCONDRIAS

AIAPb-AIAGbPb > ANAGbPb-ANAPb > AIAGb-ANAGb > AIA-ANA

RETICULO ENDOPLASMATICO Y MICROCUERPOS

ANA > AIAPb-ANAPb > AIAGbPb > ANAGbPb > AIAGb-ANAGb > AIA

1.4. CONCLUSIONES GENERALES

Efecto de la giberelina

De las observaciones anteriores podemos deducir que la Gb induce el alargamiento celular y por lo tanto aumenta el tamaño de las células, produce en ellas grandes vacuolas e inhibe la diferenciación, manteniendo el estado juvenil de los tejidos. Los cloroplastos se presentan bien organizados y poseen almidón.

Algunos de estos efectos también han sido comprobados por varios autores; así, la presencia de grandes vacuolas fué observada por Gifford y Nitsch (1969) como respuesta de las células a la aplicación de Gb. Además se conoce que la Gb está directamente implicada en la elongación celular (Juntilla, 1982; Katsumi y Ishida, 1991; Zanewich y col, 1991) e inhibe la diferenciación (Solsona, 1992).

Efecto del fenobarbital

El Pb parece potenciar la diferenciación en yemas de raíz y parte aérea, pero produce necrosación y menor tamaño de los callos en general; también desarrolla el tejido conductor y es de destacar su acción positiva sobre la formación del retículo endoplasmático, de mitocondrias y microcuerpos (orgánulos donde tienen lugar ciertas reacciones de la síntesis de cardenólidos que quedan inhibidas en los cultivos *in vitro* de *Digitalis*). Los cloroplastos aparecen desorganizados en general, con muchos plastoglóbulos y lamelas y no poseen almidón.

En nuestro laboratorio ya se había comprobado anteriormente el aumento del número de mitocondrias por acción del Pb así como su efecto desorganizador sobre los cloroplastos (Morales y col, 1992b; Solsona, 1992). Por otra parte, sabemos por la bibliografía que el Pb conduce a un gran desarrollo del RE (Weibel, 1969; Fowler, 1982; Zimmerlin y Durst, 1990).

Hemos observado que en algunos aspectos la acción del Pb depende del tipo de auxina utilizada, por ejemplo, la auxina sintética ANA ocasiona entre otros efectos una mayor desorganización de los cloroplastos, de ahí que los cloroplastos crecidos en cualquier medio ANA estén más desorganizados que los del medio AIA Pb a pesar de que el Pb posee esta

misma acción (ver secuencias más arriba).

Otras observaciones

También podríamos añadir que la adición conjunta de Gb y Pb sobre las auxinas básicas AIA y ANA da como resultado un comportamiento en el que se solapan los efectos propios de estas dos sustancias, como hemos comentado anteriormente; sin embargo hemos advertido que con frecuencia sobre la auxina natural AIA la influencia del Pb es superior a la de la Gb y en cambio sobre la auxina sintética ANA ocurre a la inversa (ver por ejemplo las secuencias de comportamiento en células, cloroplastos desorganizados, plastoglóbulos, almidón, mitocondrias, RE y microcuerpos esquematizadas más arriba, además de otros resultados que se comentan en los apartados siguientes y en los que se observa esta misma característica) :

En AIA Gb Pb ----- Pb (mayor influencia)

En ANA Gb Pb ----- Gb (" ")

RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-2

Media de las fracciones de área de varios orgánulos celulares (μm^2 orgánulo $\cdot \mu\text{m}^2$ célula $\cdot 10^{-2} \pm \text{SD}$) en células de callo de *Digitalis purpurea*, y porcentaje del área de los cloroplastos ocupada por plastoglóbulos, tilacoides y almidón, en cada uno de los 8 medios de cultivo estudiados.

CELULA

	<u>AIA</u>	<u>AIAGb</u>	<u>AIAPb</u>	<u>AIAGbPb</u>	<u>ANA</u>	<u>ANAGb</u>	<u>ANAPb</u>	<u>ANAGbPb</u>
<u>Vacuola</u> célula	79	89	50	82	80	87	61	84
<u>Cloroplasto</u> célula	2	1,8	1,7	1,6	0,9	1,2	0,6	1,4
<u>Mitocondria</u> célula	1	2	2,7	2,7	1,2	2	2,5	2,3

CLOROPLASTO (%)

<u>A.plastoglóbulo</u> A.cloroplasto	7,5	7,5	8,5	8	2	1,5	4,5	3
<u>A.tilacoides</u> A.cloroplasto	35	42	20	36	9	32	8	31
<u>A.almidón</u> A.cloroplasto	7	22	0	0	5	3	0	23

RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-14

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio AIA (4.200 aumentos).

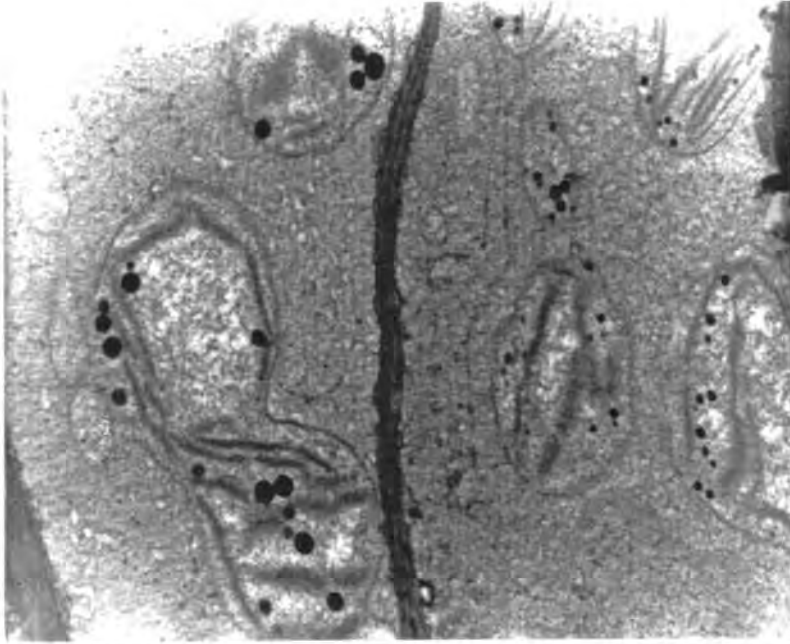


FIGURA R-15

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio AIA Gb mostrando un cloroplasto con almidón (10.000 aumentos).

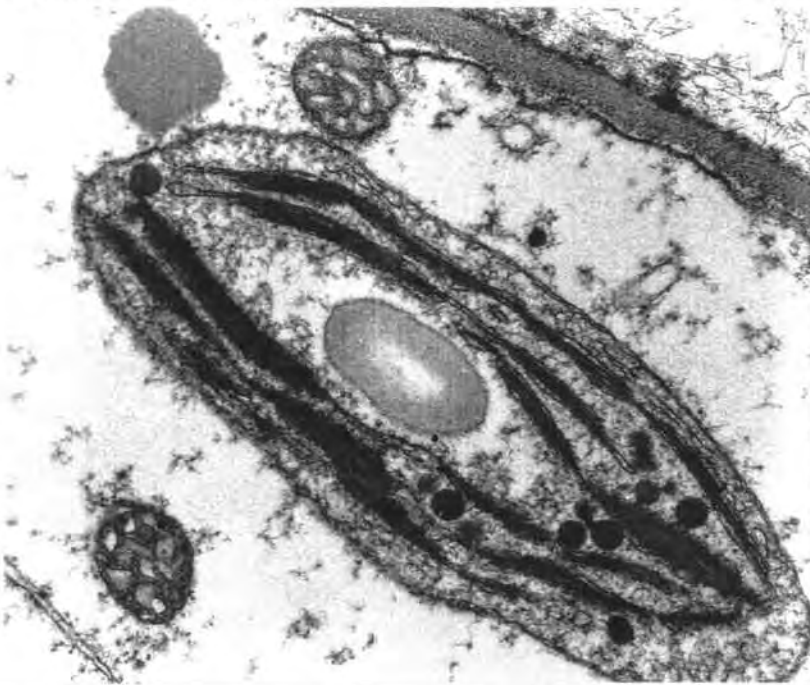


FIGURA R-16

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio AIA Gb (3.300 aumentos). Se observan varios proplastidios con granos de almidón.



FIGURA R-17

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio AIA Pb (13.000 aumentos). Abundantes plastoglóbulos.



FIGURA R-18

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio AIA Pb (5.500 aumentos). Cloroplastos.

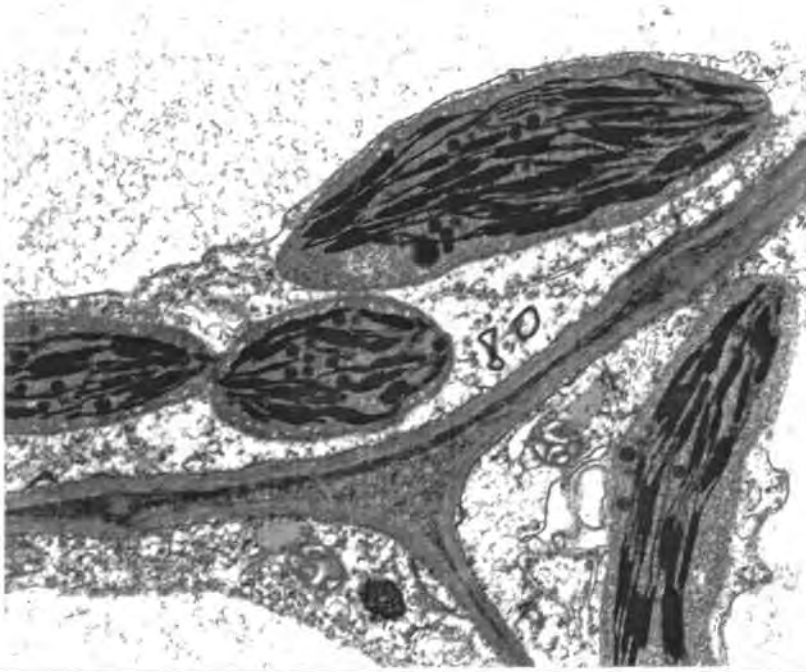
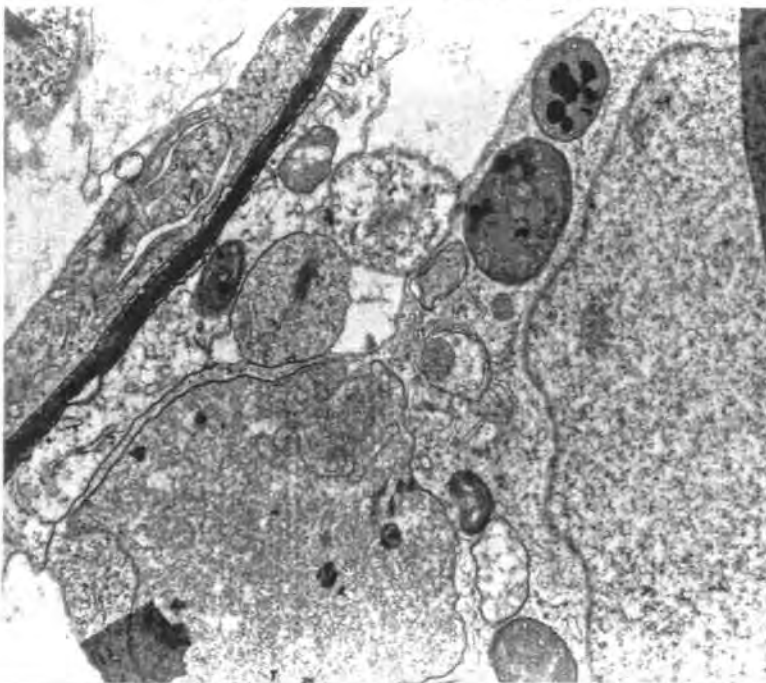


FIGURA R-19

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio AIA Pb (4.200 aumentos).



RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-20

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio
AIA Gb Pb (5.500 aumentos).

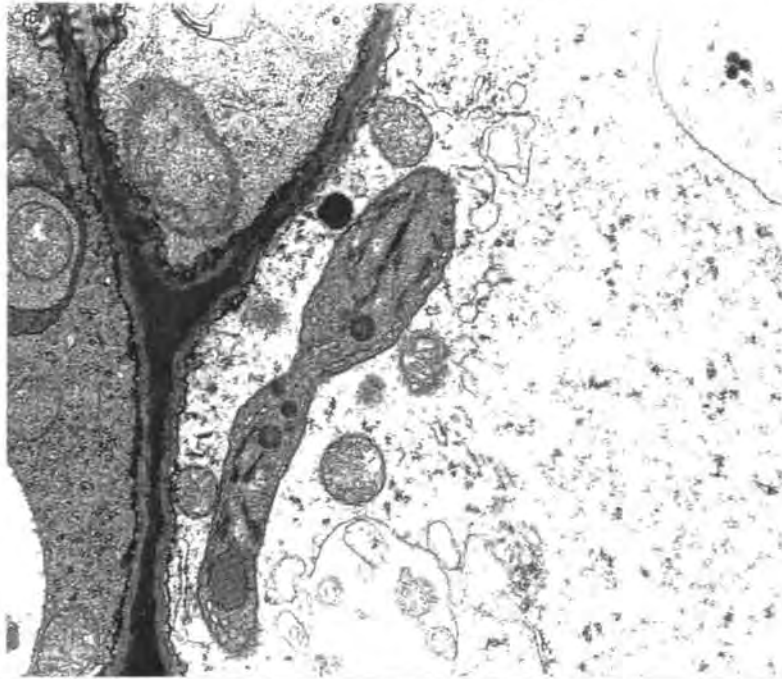
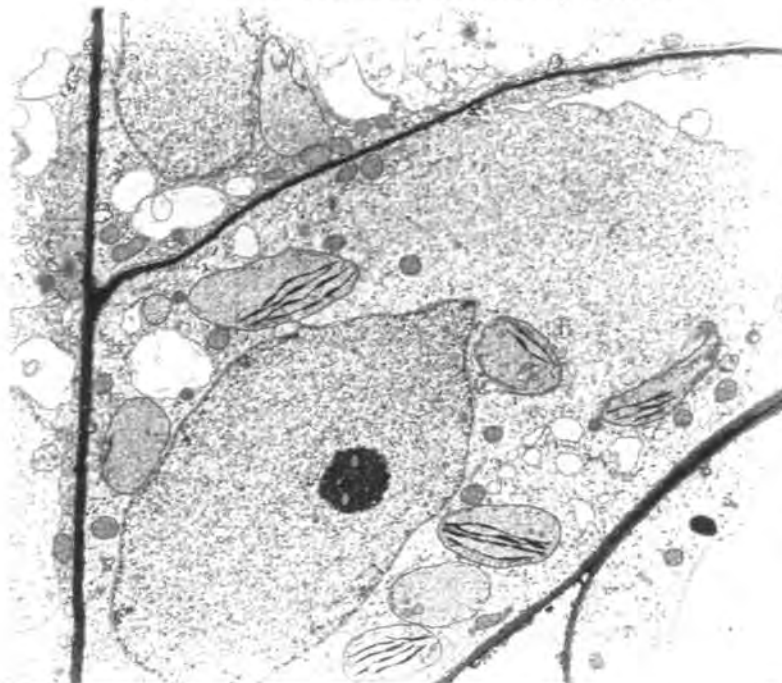


FIGURA R-21

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio
AIA Gb Pb (1.600 aumentos). Proplastidios.



RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-22

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio ANA (10.000 aumentos).

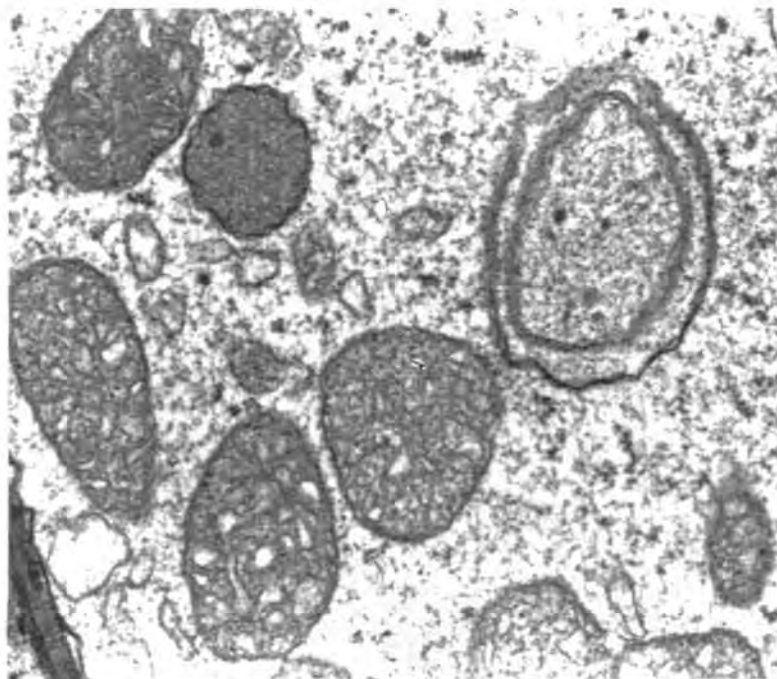


FIGURA R-23

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio ANA Gb (5.500 aumentos).

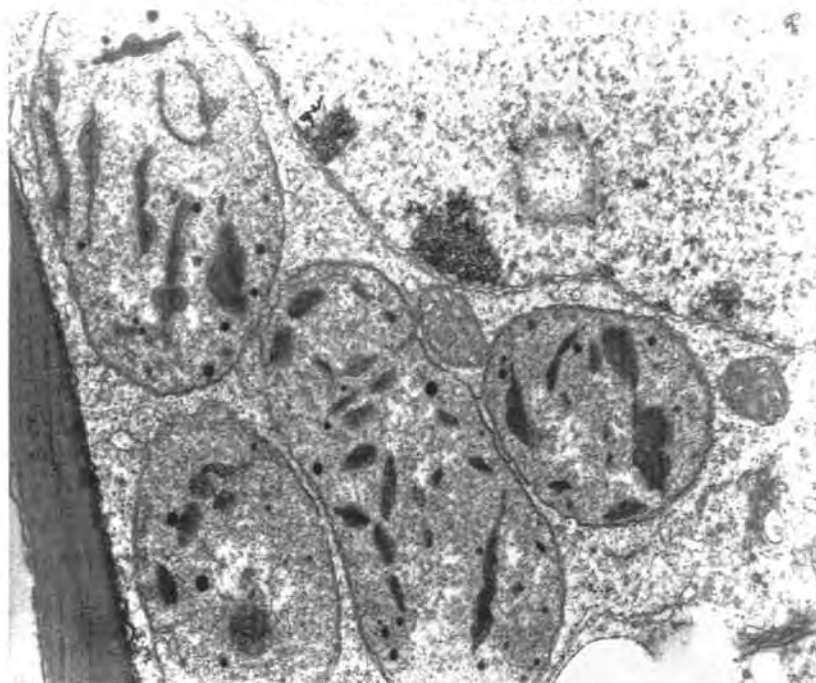


FIGURA R-24

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio
ANA Gb (7.200 aumentos).

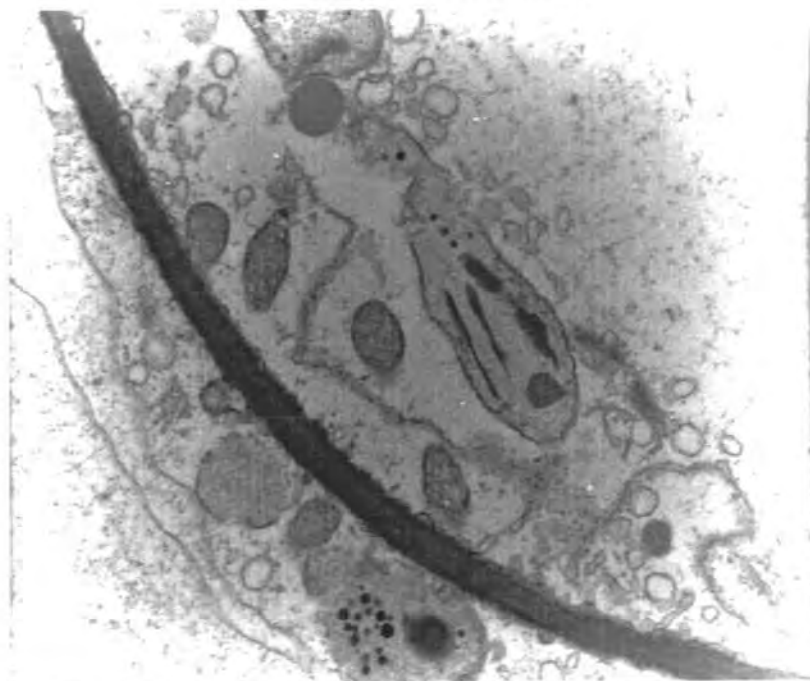


FIGURA R-25

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio
ANA Pb (4.200 aumentos).

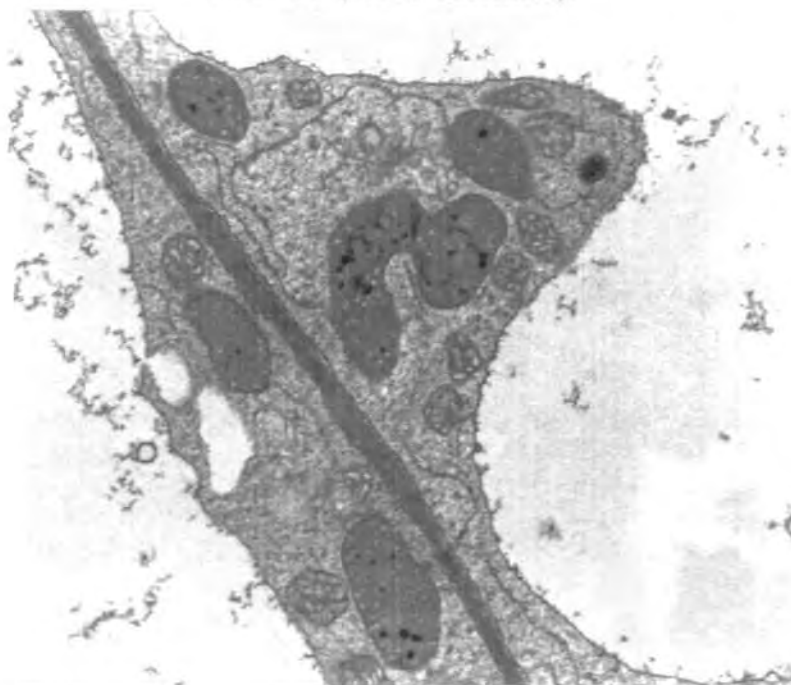


FIGURA R-26

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio
ANA Pb (13.000 aumentos).

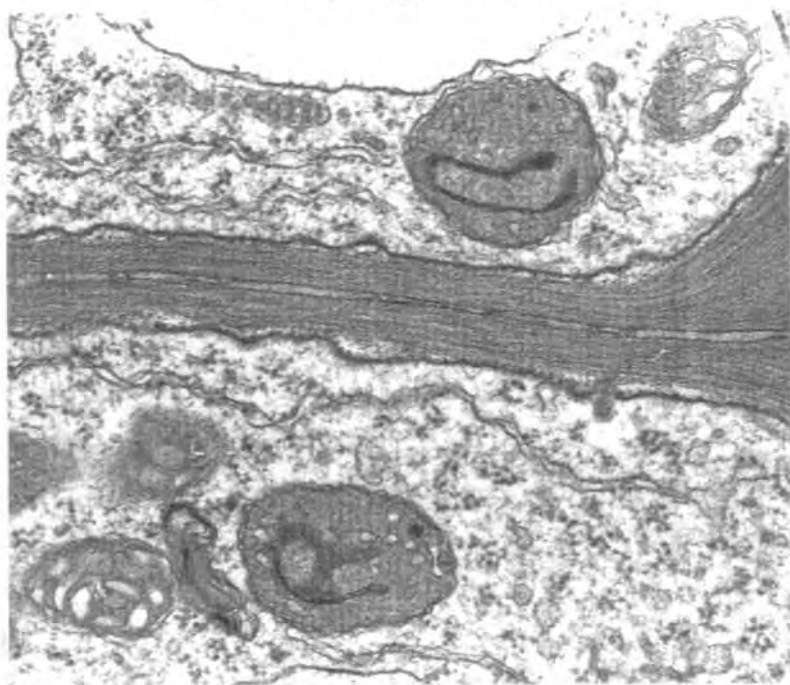
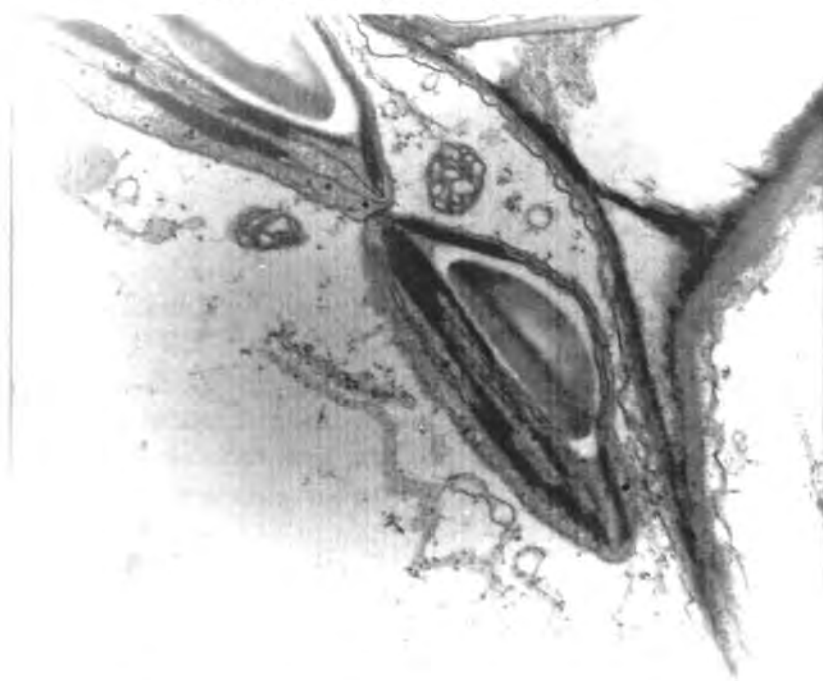


FIGURA R-27

Ultraestructura de los callos crecidos en el medio
ANA Gb Pb (5.000 aumentos).



2. CRECIMIENTO

Los valores de Peso fresco y de Peso seco (expresados en gramos) de los callos crecidos en los 8 medios de cultivo estudiados, se muestran ascendentes hasta la 5ª semana del experimento, disminuyendo a continuación hasta el final del mismo.

2.1.PESO FRESCO

2.1.1.MEDIO AIA:

2.1.1.1.Adición de Giberelina

La adición de Giberelina al medio de cultivo suplementado con la auxina natural AIA provoca un incremento en el peso fresco de los callos en relación a los callos crecidos sin Giberelina.

2.1.1.2.Adición de Fenobarbital

La adición exclusiva de Fenobarbital al medio AIA reduce el Peso fresco de los callos durante todo el experimento respecto a los callos crecidos en AIA, AIA Gb y AIA Gb Pb. Es de destacar que los callos crecidos en este medio presentan los valores más bajos de Peso fresco de los 8 medios estudiados.

2.1.1.3.Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital

Los Pesos frescos de los callos crecidos en el medio suplementado con AIA Gb y Pb, presentan en general valores ligeramente inferiores a los correspondientes a los callos crecidos en medio AIA Gb (que es el medio que presenta valores superiores entre todos los AIA), debido probablemente a una interacción negativa entre Gb y Pb.

2.1.2.MEDIO ANA :

2.1.2.1.Adición de Giberelina.

La adición de Giberelina produce en general un aumento en el Peso fresco de los callos crecidos en medio ANA, al igual que ocurría con la adición de Giberelina al medio AIA; es destacable el hecho de que los callos crecidos en este medio presentan los valores de Peso fresco más altos entre todos los medios estudiados, y por tanto también respecto a AIA Gb.

2.1.2.2. Adición de Fenobarbital

La adición de Pb al medio ANA provoca una ligera activación del crecimiento medido como Peso fresco hasta la 2ª semana si se compara con los valores correspondientes a los callos crecidos en el medio ANA; pero a partir de este momento se observa una drástica disminución de la proporción de crecimiento medido como Peso fresco, evidentemente producida por la necrosación experimentada por los tejidos.

Se pueden observar también aquí valores más altos en ANA Pb respecto a AIA Pb, exceptuando la 5ª semana de crecimiento.

2.1.2.3. Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital

El medio ANA Gb Pb se muestra ligeramente activador del crecimiento, puesto que los valores de Peso fresco de los callos crecidos en él son superiores a los valores correspondientes a los callos crecidos en medio ANA, especialmente durante las tres primeras semanas. Sin embargo si se comparan estos valores con los de ANA Gb se observa que disminuyen después de la 1ª semana por lo cual podemos decir que el Pb produce en general una disminución del crecimiento, medido como Peso fresco, a lo largo de toda la experiencia. Es decir, hay una interacción entre Gb y Pb, influyendo en mayor grado, en este medio, la Gb que el Pb.

En relación a ANA Pb los valores son marcadamente más altos para ANA Gb Pb.

2.1.3. ANALISIS DE LA VARIANZA DE LOS PESOS FRESCOS :

Estudio de la significación del factor tiempo :

Ho: no hay diferencias entre semanas/contraria H1: hay diferencias

Desviación	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadrados med.	F
Hipótesis	5	23,790	4,7580	
Residuo	406	7,100	0,17488	27
Total	411	30,890		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,2362. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio de la significación del factor medio :

Ho: no hay diferencias entre medios/contra H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	7	10,639	1,5198	
Residuo	406	7,1001	0,17488	86,9
Total	413	17,739		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,0321. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Considerando que no hay interacción entre los dos factores estudiados (tiempo y medios) y según los resultados obtenidos al efectuar el análisis de la varianza, con un nivel de significación de 0,05, sobre los datos de Peso fresco que resumimos en la Tabla R-3, podemos afirmar que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos, es decir, hay diferencias entre las semanas de crecimiento y hay diferencias entre los medios considerados, en relación al aumento de Peso fresco de los callos estudiados.

Una vez sabido que las semanas y los medios son diferentes estadísticamente respecto al aumento de Peso fresco, es necesario conocer, para las semanas y para los medios, cuales entre ellos difieren estadísticamente de los demás y si hay algunos iguales estadísticamente (producen los mismos efectos sobre la medida considerada). Para ello realizamos comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni, es decir, comparamos los factores dos a dos con unos niveles de significación tales que el nivel de significación global continúe siendo 0,05 o inferior.

Se obtuvo que en las comparaciones entre semanas el nivel de significación individual para cada ensayo era de $\alpha=0,05/15=0,003$ y en las comparaciones entre los medios el nivel de significación individual aplicado era de $\alpha=0,05/28=0,0017$ (aprox. 0,002), pues había que considerar en este caso 28 hipótesis posibles.

RESULTADOS Y DISCUSION

2.1.4. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LAS SEMANAS DE CRECIMIENTO (BONFERRONI) :

1ª semana/2ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 2ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,24761	0,24761	
Residuo	406	7,1001	0,17488	14,2
Total	407	7,3477		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003 es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	4,2639	4,2639	
Residuo	406	7,1001	0,17488	244
Total	407	11,364		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003 es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	5,7060	5,7060	
Residuo	406	7,1001	0,17488	326
Total	407	12,806		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003 es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

1ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	16,457	16,457	
Residuo	406	7,1001	0,17488	941
Total	407	23,558		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003 es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	9,6057	9,6057	
Residuo	406	7,1001	0,17488	549
Total	407	16,706		

La región crítica, con nivel de significación de 0,003 es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/3ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 3ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,4046	2,4046	
Residuo	406	7,1001	0,17488	138
Total	407	9,5047		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003 es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/4ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd.Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,5459	3,5459	
Residuo	406	7,1001	0,17488	203
Total	407	10,646		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003 es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/5ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	12,396	12,396	
Residuo	406	7,1001	0,17488	709
Total	407	19,496		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/6ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	6,6631	6,6631	
residuo	406	7,1001	0,17488	381
Total	407	13,763		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

3ª semana/4ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 4ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,14914	0,14914	
Residuo	406	7,1001	0,17488	8,53
<hr/>				
Total	407	7,2492		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

3ª semana/5ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,7981	3,7981	
Residuo	406	7,1001	0,17488	217
<hr/>				
Total	407	10,898		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/6ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 3ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,1297	1,1297	
Residuo	406	7,1001	0,17488	64,6
<hr/>				
Total	407	8,2298		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

4ª semana/5ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 5ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,2199	2,2199	
Residuo	406	7,1001	0,17488	127
<hr/>				
Total	407	9,3200		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

4ª semana/6ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 4ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. Lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,42214	0,42214	
Residuo	406	7,1001	0,17488	24,1
<hr/>				
Total	407	7,5222		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

5ª semana/6ª semana :

Ho: no hay diferencias entre la 5ª y la 6ª semana/ H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,69425	0,69425	
Residuo	406	7,1001	0,17488	39,7
<hr/>				
Total	407	7,7943		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

La aplicación del método Bonferroni para contrastar las semanas de crecimiento indica:

-- Se da cierta semejanza entre la 3ª y 4ª semana pero no podemos afirmar que sean estadísticamente iguales.

-- En general, podemos decir que cada semana difiere estadísticamente de las demás.

2.1.5. COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LOS MEDIOS (BONFERRONI):

Medio AIA/Medio AIA Gb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,77455	0,77455	
Residuo	406	7,1001	0,17488	4,43
Total	407	7,1775		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,20323	0,20323	
Residuo	406	7,1001	0,17488	11,6
Total	407	7,3033		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,43521	0,43531	
Residuo	406	7,1001	0,17488	0,249
Total	407	7,1001		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,8260	1,8260	
Residuo	406	7,1001	0,17488	104
Total	407	8,9260		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,1488	3,1488	
Residuo	406	7,1001	0,17488	180
Total	407	10,249		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,68906	0,68906	
Residuo	406	7,1001	0,17488	3,94
Total	407	7,1690		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,9762	1,9762	
Residuo	406	7,1001	0,17488	113
Total	407	9,0762		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,57498	0,57498	
Residuo	406	7,1001	0,17488	32,9
Total	407	7,6751		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,82429	0,82429	
Residuo	406	7,1001	0,17488	4,71
Total	407	7,1825		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,3080	1,3080	
Residuo	406	7,1001	0,17488	74,8
Total	407	8,4081		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,5348	2,5348	
Residuo	406	7,1001	0,17488	145
Total	407	9,6349		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,30146	0,30146	
Residuo	406	7,1001	0,17488	17,2
Total	407	7,4015		

La región crítica , con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,28550	0,28550	
Residuo	406	7,1001	0,17488	16,3
Total	407	7,3856		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio AIA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,19963	0,19963	
Residuo	406	7,1001	0,17488	11,4
Total	407	7,2997		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	3,3617	3,3617	
Residuo	406	7,1001	0,17488	192
Total	407	10,462		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb :

Ho: no hay diferencia entre medio AIA Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencia

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	5,0812	5,0812	
Residuo	406	7,1001	0,17488	291
Total	407	12,181		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencia entre medio AIA Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencia

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,31090	0,31090	
Residuo	406	7,1001	0,17488	1,78
Total	407	7,1312		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,5767	3,5767	
Residuo	406	7,1001	0,17488	205
Total	407	10,677		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	1,8735	1,8735	
Residuo	406	7,1001	0,17488	107
Total	407	8,9736		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	3,2137	3,2137	
Residuo	406	7,1001	0,17488	184
Total	407	10,314		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/ Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,66327	0,66327	
Residuo	406	7,1001	0,17488	3,79
Total	407	7,1664		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,0212	2,0212	
Residuo	406	7,1001	0,17488	116
Total	407	9,1213		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Gb :

Ho: no hay diferencia entre medio ANA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,20616	0,20616	
Residuo	406	7,1001	0,17488	11,8
Total	407	7,3062		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencia entre medio ANA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,5431	2,5431	
Residuo	406	7,1001	0,17488	145
Total	407	9,6432		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencia entre medio ANA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,24198	0,24198	
Residuo	406	7,1001	0,17488	0,138
Total	407	7,1025		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Pb :

Ho: no hay diferencia entre medio ANA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	4,0236	4,0236	
Residuo	406	7,1001	0,17488	230
Total	407	11,124		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio ANA Gb/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencia entre medio ANA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,16589	0,16589	
Residuo	406	7,1001	0,17488	9,49
Total	407	7,2660		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio ANA Pb/Medio ANA Gb Pb :

Ho: no hay diferencia entre medio ANA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	2,7147	2,7147	
Residuo	406	7,1001	0,17488	155
Total	407	9,8148		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

La aplicación del método Bonferroni para contrastar los medios indica:

___ Hay cierta semejanza estadística entre los siguientes medios con respecto al Peso fresco

AIA-AIA Gb	AIA Gb-AIA Gb Pb	ANA-ANA Gb Pb
AIA-AIA Gb Pb	AIA Pb-ANA Pb	ANA Gb-ANA Gb Pb
AIA-ANA Pb	AIA Gb Pb-ANA Pb	

* Los medios ANA difieren de los medios AIA con excepción del medio ANA Pb por ser el que presenta valores más bajos dentro de la serie ANA.

* El medio óptimo, ANA Gb, interacciona con el medio ANA Gb Pb pero no con el ANA.

* Todos los medios AIA están relacionados entre sí y también con el ANA Pb.

* El medio AIA Gb (el de valores superiores dentro de la serie AIA) es el único que no se relaciona con los medios AIA Pb y ANA Pb que representan en ambos casos los valores más bajos para cada serie.

___ Sin embargo, estadísticamente, aunque algunos medios anteriores coinciden en parte, no pueden ser sustituidos uno por otro para lograr los mismos efectos.

RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-3: Peso fresco (g)¹

Medios

Semanas	AIA	AIA Gb	AIA Pb	AIA GbPb
1 ^a	0,1556±0,02	0,1833±0,029	0,1324±0,010	0,1742±0,01
2 ^a	0,1841±0,02	0,2576±0,061	0,1618±0,069	0,2864±0,04
3 ^a	0,4118±0,07	0,4850±0,105	0,2718±0,077	0,3410±0,07
4 ^a	0,4359±0,08	0,4980±0,030	0,3780±0,042	0,4030±0,07
5 ^a	0,7682±0,05	0,8515±0,227	0,6565±0,050	0,7430±0,04
6 ^a	0,5938±0,04	0,6023±0,111	0,4576±0,049	0,5935±0,05

	ANA	ANA Gb	ANA Pb	ANA GbPb
1 ^a	0,1998±0,02	0,2319±0,028	0,2008±0,021	0,2681±0,04
2 ^a	0,2979±0,04	0,3872±0,052	0,3152±0,036	0,3212±0,03
3 ^a	0,7204±0,01	0,9380±0,181	0,3334±0,037	0,7651±0,03
4 ^a	0,9052±0,11	0,9420±0,124	0,3823±0,037	0,8431±0,07
5 ^a	1,1663±0,15	1,1324±0,073	0,5114±0,069	1,0471±0,20
6 ^a	0,9301±0,14	1,0957±0,191	0,4697±0,050	0,9868±0,11

¹ Cada valor es la media de 12 determinaciones ± S.D.

RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA R-4: Relaciones de Peso fresco entre los medios AIA y los medios ANA durante las 6 semanas de cultivo.

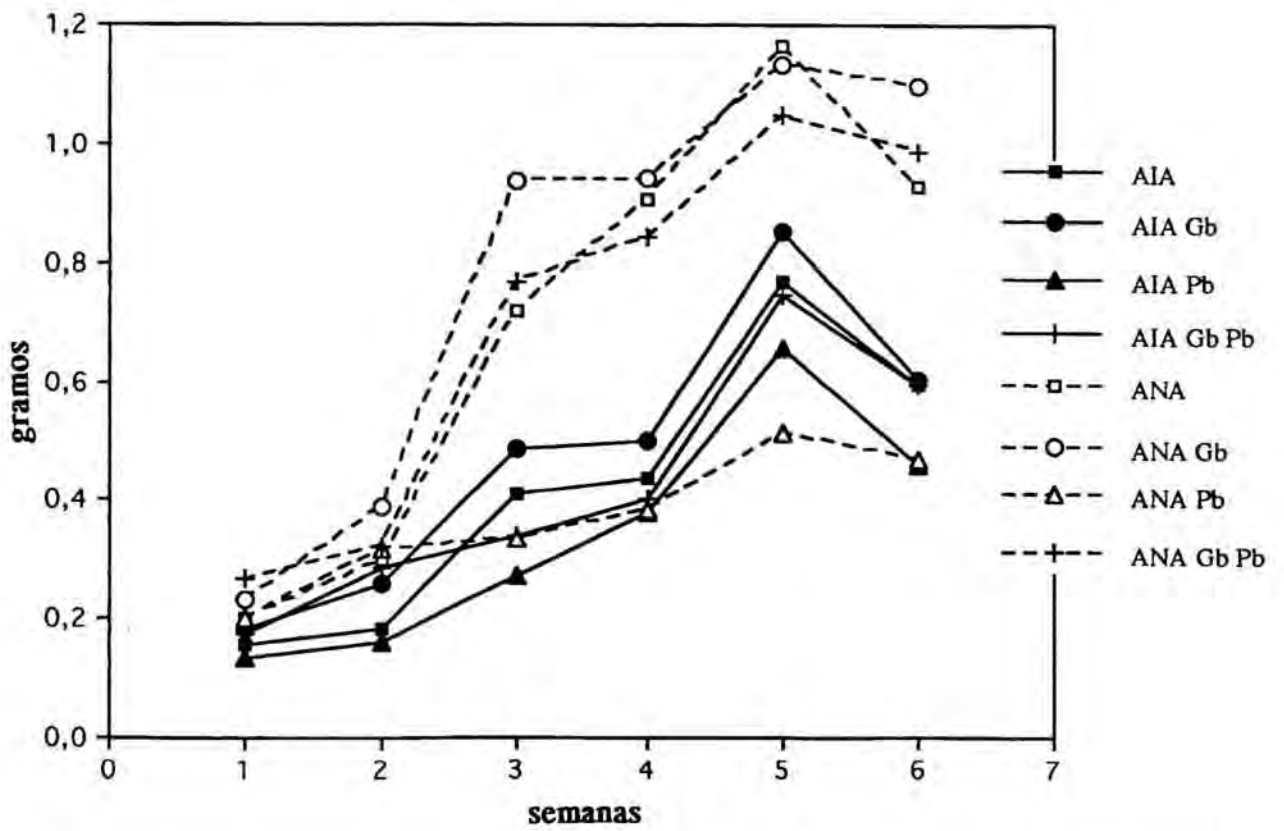
Relaciones entre Medios

<u>Semanas</u>	<u>AIA</u> <u>ANA</u>	<u>AIA Gb</u> <u>ANA Gb</u>	<u>AIA Pb</u> <u>ANA Pb</u>	<u>AIA Gb Pb</u> <u>ANA Gb Pb</u>
1ª	0,778	0,790	0,659	0,649
2ª	0,617	0,665	0,513	0,891
3ª	0,571	0,517	0,815	0,445
4ª	0,481	0,528	0,988	0,477
5ª	0,658	0,751	1,283	0,709
6ª	0,638	0,549	0,974	0,061

RESULTADOS Y DISCUSION

FIGURA R-28

Peso fresco expresado en gramos (g).



RESULTADOS Y DISCUSION

2.1.6.DISCUSION :

Según los resultados obtenidos al realizar el análisis de la varianza sobre los datos de Peso fresco que resumimos en la Tabla R-3, podemos concluir que tanto el factor tiempo como el factor medio tienen un efecto significativo sobre los resultados obtenidos.

Analizando las diferentes semanas, vemos que todas ellas afectan de forma diferente al aumento de Peso fresco de los callos estudiados.

Analizando los diferentes medios ensayados, observamos que algunos de ellos coinciden en parte pero estadísticamente no son iguales y por lo tanto sus efectos sobre el Peso fresco no son idénticos (ver apartado III.2.1.5.).

Relacionando estos datos estadísticos con los que se observan en las Tablas R-3 y R-4 para cada medio estudiado podemos decir:

1) Los valores de los medios ANA son superiores a sus correspondientes AIA (excepto la 5ª semana AIA Pb).

2) Entre los medios AIA :

Los valores más altos corresponden a AIA Gb (exceptuando la 2ª semana respecto a AIA Gb Pb)

Los valores más bajos corresponden a AIA Pb

3) Entre los medios ANA :

Los valores más altos corresponden a ANA Gb (exceptuando la 1ª semana ANA Gb Pb y la 5ª ANA)

Los valores más bajos corresponden a ANA Pb (exceptuando la 1ª y 2ª semanas ANA)

4) De los 8 medios estudiados los valores más altos corresponden a ANA Gb (excepto la 1ª semana ANA Gb Pb)

5) De los 8 medios estudiados los valores más bajos corresponden a AIA Pb (excepto su 5ª semana)

Como consecuencia de lo expuesto podemos concluir que el Pb disminuye en general el crecimiento medido como Peso fresco, mientras que la Gb lo aumenta. Estas dos sustancias administradas conjuntamente muestran interacciones que se reflejan durante las dos primeras semanas dando valores más altos respecto a los medios control (AIA y ANA) e incluso a los medios con Gb, debido seguramente a una mayor influencia de la Gb; mientras que a partir de la 3ª semana el Pb empieza a destacar y los valores disminuyen hasta el final del experimento respecto a los medios control y control+Gb, pero no respecto a los medios control+Pb que siguen manteniendo siempre los valores más bajos (ver Figura R-28).

2.2. PESO SECO

2.2.1.MEDIO AIA :

2.2.1.1.Adición de Giberelina

El Peso seco de los callos crecidos en medio adicionado con Giberelina presentan valores superiores a los correspondientes a los callos crecidos sobre el medio AIA practicamente a lo largo de todo el experimento (Tabla R-5 y Figura R-29).

Esto demuestra que el aumento de Peso fresco comentado anteriormente se debe además de a una mayor toma de agua, como demuestra el % de agua de los callos crecidos en medio AIA Gb respecto al medio AIA (ver Tablas R-6 y R-7), también a un incremento en el metabolismo.

2.2.1.2.Adición de Fenobarbital

Los callos crecidos en el medio adicionado con Fenobarbital presentan valores de Peso seco superiores a los observados para los callos crecidos en medio AIA y AIA Gb a partir de la tercera semana de crecimiento. Asi pues, el Fenobarbital aumenta la proporción de Peso seco, y sería conveniente discernir si es sobre productos primarios ligados al crecimiento, o contribuyen a este aumento de Peso seco los productos secundarios debidos a una parcial necrosación (Figura R-29).

La Tabla R-7 muestra que el % de agua en este medio es inferior al de los medios AIA y AIA Gb.

2.2.1.3.Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital

Los callos crecidos en medio AIA Gb Pb muestran durante las dos primeras semanas de crecimiento valores de Peso seco superiores a los de los callos crecidos en los medios AIA y AIA Gb, pero a partir de este momento dichos valores de Peso seco se muestran generalmente inferiores o se igualan a los valores obtenidos en los dos medios mencionados.

En cuanto al % de agua, se observa en la Tabla R-7 que durante las dos primeras semanas el comportamiento del medio AIA Gb Pb es parecido al del medio AIA Pb, mientras que a partir de la tercera semana de crecimiento el % de agua es similar al del medio AIA Gb.

Estos hechos indican que el medio AIA Gb Pb se muestra intermediario entre los medios AIA Gb y AIA Pb, de modo que durante las dos primeras semanas de crecimiento el Pb actuaría más intensamente produciendo una mayor cantidad de Peso seco, y a partir de la tercera semana se notaría más el efecto de la Giberelina sobre la toma de agua y la disminución del crecimiento medido como Peso seco; no obstante Gb y Pb interaccionan

RESULTADOS Y DISCUSION

mutuamente de modo más complejo.

2.2.2.MEDIO ANA :

2.2.2.1.Adición de Giberelina

La adición de Giberelina al medio de cultivo ANA , no modifica la pauta seguida por los Pesos secos observada para el medio ANA.

El % de agua se muestra en general superior al añadir Giberelina, esto apoya el hecho de que sea este medio el que presenta un mayor crecimiento medido en Peso fresco (así lo indicamos anteriormente) como consecuencia de un mayor incremento en la toma de agua principalmente.

2.2.2.2.Adición de Fenobarbital

La presencia de Fenobarbital en el medio de cultivo, provoca en los callos crecidos en él un Peso seco ligeramente superior al observado para los callos crecidos en medio ANA o en ANA Gb, durante las dos primeras semanas de la experiencia; y a partir de este momento, los Pesos secos se muestran muy inferiores, al igual que el % de agua (Tabla R-7). Lo que indica que el Fenobarbital adicionado al medio de cultivo suplementado con la auxina de síntesis ANA, disminuye tanto el crecimiento real como la toma de agua.

2.2.2.3.Adición conjunta de Giberelina y Fenobarbital

La adición de Gb y Pb al medio de cultivo suplementado con ANA provoca valores de Peso seco, en los callos crecidos en él, ligeramente inferiores a los observados para los callos crecidos en medio ANA Gb, pero muy superiores a los correspondientes a los callos crecidos en ANA Pb; lo cual nos indica que el efecto inhibitor del Pb ha quedado paliado en parte debido a la presencia de Gb en el medio de cultivo.

2.2.3.ANALISIS DE LA VARIANZA DE LOS PESOS SECOS:

Estudio de la significación del factor tiempo:

Ho: no hay diferencias entre semanas/contr H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadrad. med.	F
Desviación				
Hipótesis	5	0,98379	0,19676	
Residuo	406	0,19949	0,49134	400
Total	411	0,11833		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,2362. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Estudio de la significación del factor medio:

Ho: no hay diferencias entre semanas/contra H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	5	0,12943	0,18490	
Residuo	406	0,19949	0,19676	37,6
Total	413	0,32892		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,05, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 2,0321. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Al igual que ocurría con el Peso fresco, también aquí los resultados del análisis de la varianza sobre el Peso seco nos muestran que hay diferencias entre las semanas de crecimiento y hay diferencias entre los medios considerados, en relación al aumento de Peso seco de los callos estudiados.

Una vez conocido esto, debemos saber para las semanas y para los medios cuales entre ellos difieren estadísticamente de los demás y si hay algunos iguales. Para ello realizamos comparaciones múltiples utilizando el método de Bonferroni.

Se obtuvo que en las comparaciones entre semanas el nivel de significación individual para cada ensayo era de 0,003 y en las comparaciones entre los medios el nivel de significación individual aplicado era de 0,002.

2.2.4.COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LAS SEMANAS DE CRECIMIENTO (BONFERRONI):

1ª semana/2ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 2ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,21042	0,21042	
Residuo	406	0,19949	0,49134	42,8
Total	407	0,22053		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 3ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,16522	0,16522	
Residuo	406	0,19949	0,49134	336
Total	407	0,36471		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª semana y la 4ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,28586	0,28586	
Residuo	406	0,19949	0,49134	582
Total	407	0,48534		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

1ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª semana y la 5ª semana/H1: hay diferencias

	Grd.lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,68878	0,68878	
Residuo	406	0,19949	0,49134	140
Total	407	0,88826		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

1ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 1ª y la 6ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,42959	0,42959	
Residuo	406	0,19949	0,49134	874
Total	407	0,62907		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/3ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 3ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,67262	0,67262	
Residuo	406	0,19949	0,49134	137
Total	407	0,26675		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª semana y la 4ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,15218	0,15218	
Residuo	406	0,19949	0,49134	310
Total	407	0,35166		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

2ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª semana y la 5ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,46113	0,46113	
Residuo	406	0,19949	0,49134	939
<hr/>				
Total	407	0,66062		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

2ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 2ª y la 6ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,25886	0,25886	
Residuo	406	0,19949	0,49134	527
<hr/>				
Total	407	0,45834		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/4ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª semana y la 4ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,19198	0,19198	
Residuo	406	0,19949	0,49134	39,1
<hr/>				
Total	407	0,21868		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

3ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª semana y la 5ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,17285	0,17285	
Residuo	406	0,19949	0,49134	352
Total	407	0,37234		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

3ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 3ª semana y la 6ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,64881	0,64881	
Residuo	406	0,19949	0,49134	132
Total	407	0,26437		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

4ª semana/5ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª semana y la 5ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,69265	0,69265	
Residuo	406	0,19949	0,49134	141
Total	407	0,26875		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

4ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 4ª semana y la 6ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,12504	0,12504	
Residuo	406	0,19949	0,49134	25,4
Total	407	0,21199		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

5ª semana/6ª semana:

Ho: no hay diferencias entre la 5ª semana y la 6ª semana/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,22385	0,22385	
Residuo	406	0,19949	0,49134	45,6
Total	407	0,22187		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,003, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 8,9148. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

La aplicación del método Bonferroni para contrastar las semanas de crecimiento indica que, para el Peso seco, todas las semanas difieren estadísticamente de las demás.

2.2.5.COMPARACIONES MULTIPLES PARA CONTRASTAR LOS MEDIOS (BONFERRONI):

Medio AIA/Medio AIA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,19434	0,19434	
Residuo	406	0,19949	0,49134	3,96
Total	407	0,20143		

RESULTADOS Y DISCUSION

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,42151	0,42151	
Residuo	406	0,19949	0,49134	8,58
Total	407	0,20370		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,20755	0,20755	
Residuo	406	0,19949	0,49134	4,22
Total	407	0,20156		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,49970	0,49970	
Residuo	406	0,19949	0,49134	102
Total	407	0,24946		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,57538	0,57538	
Residuo	406	0,19949	0,49134	117
Total	407	0,25702		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,46486	0,46486	
Residuo	406	0,19949	0,49134	0,946
Total	407	0,19995		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,29822	0,29822	
Residuo	406	0,19949	0,49134	60,7
Total	407	0,22931		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio AIA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,54719	0,54719	
Residuo	406	0,19949	0,49134	1,11
Total	407	0,20003		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,12608	0,12608	
Residuo	406	0,19949	0,49134	0,257
Total	407	0,19950		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,36167	0,36167	
Residuo	406	0,19949	0,49134	73,6
Total	407	0,23565		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Gb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,43065	0,43065	
Residuo	406	0,19949	0,49134	87,6
<hr/>				
Total	407	0,24255		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,42145	0,42145	
Residuo	406	0,19949	0,49134	0,858
<hr/>				
Total	407	0,19991		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Gb/ Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,55076	0,55076	
Residuo	406	0,19949	0,49134	1,12
<hr/>				
Total	407	0,20004		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio AIA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio AIA Gb Pb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,35779	0,35779	
Residuo	406	0,19949	0,49134	0,728
Total	407	0,19984		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,25785	0,25785	
Residuo	406	0,19949	0,49134	52,5
Total	407	0,22527		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb/H1: hay diferencias

Desviación	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Hipótesis	1	0,31552	0,31552	
Residuo	406	0,19949	0,49134	64,2
Total	407	0,23104		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

RESULTADOS Y DISCUSION

Medio AIA Pb/Medio ANA Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,17345	0,17345	
Residuo	406	0,19949	0,49134	3,53
Total	407	0,20122		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula.

Medio AIA Pb/Medio ANA Gb Pb:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Pb y medio ANA Gb Pb/H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,11820	0,11820	
Residuo	406	0,19949	0,49134	24,1
Total	407	0,21131		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

Medio AIA Gb Pb/Medio ANA:

Ho: no hay diferencias entre medio AIA Gb Pb y medio ANA /H1: hay diferencias

	Grd. lib.	Suma de cuadrados	Cuadr. med.	F
Desviación				
Hipótesis	1	0,31745	0,31745	
Residuo	406	0,19949	0,49134	64,6
Total	407	0,23123		

La región crítica, con un nivel de significación de 0,002, es el conjunto de las muestras cuya F es mayor que 9,6748. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.