



CELULAS TRANSFORMADAS DE *Galphimia glauca* PRODUCTORAS DE NOR-FRIEDELANOS

Anabel Ortiz-Caltempa¹, Alexandre Cardoso-Taketa², Mario Rodríguez M.², Jesús Arellano³, Ma. Luisa Villarreal¹

¹ Dra. Anabel Ortiz Caltempa, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca 62209 Morelos, México. E-mail: anabel@uaem.mx. Tel: 01 777 3 297057 Fax: 01 777 3 297030

Palabras clave: *Galphimia glauca*, triterpenos, transformadas

Introducción. *Galphimia glauca* es una especie de interés medicinal que sintetiza una familia de compuestos del tipo nor- seco friedelanos conocidos como galfiminas (A-I) con actividad sedante y ansiolítica⁽¹⁾. En cultivos de raíces transformadas de esta especie se aislaron e identificaron tres nor-friedelanos relacionados a las galfiminas que fueron denominados como glaucacetalinas A-C⁽²⁾. Las glaucacetalinas no se acumulan en plantas silvestres ni en cultivos no transformados de esta especie. A pesar de que los cultivos de raíces transformadas ofrecen ventajas importantes, su escalamiento en volúmenes mayores suele ser complicado. El objetivo del presente trabajo fue establecer un cultivo de células transformadas en suspensión de *G. glauca* con la capacidad de sintetizar triterpenos del tipo nor-friedelano con interés farmacológico.

Metodología. El cultivo de células transformadas se generó a partir de callos de *G. glauca* que crecieron en cultivos de raíces infectadas con *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834⁽²⁾. Su crecimiento se estableció en medio MS sin fitorreguladores y PVP. Se realizó la comprobación de la transformación genética por análisis de PCR⁽²⁾ y *Southern blotting*. Los productos generados se elucidaron por técnicas de espectroscopia y espectrométricas de alta resolución. La producción de los nor-friedelanos, se estudió en cinéticas de cultivos tipo batch. Las actividades sedante y ansiolítica de la glaucacetalina A se investigaron mediante el modelo de la cruz elevada y de hipnosis inducida con pentobarbital.

Resultados y discusión. Este trabajo muestra el establecimiento de un cultivo de células transformadas de *G. glauca* en suspensión denominada (GgBa), la cual a sido subcultivada por mas de 3 años en medio MS sin fitohormonas. Los análisis de PCR y Southern-blot confirmaron la presencia del *gen rol A* el cual esta integrado dentro del genoma de la planta. El cultivo Batch de la línea celular GgBa fue crecida por 32 días, en ausencia de fitohormonas. Los análisis de la cinética de crecimiento mostraron que la velocidad de crecimiento específica (μ) fue de 0.13 d^{-1} , y una biomasa máxima de

24.3 g L^{-1} . El cultivo GgBa sintetizó los nor-friedelanos: glaucacetalina A (GA) y ácido maslínico, reportados en estudios previos, con una acumulación máxima de 2.89 mg L^{-1} y 2.4 mg L^{-1} respectivamente. En adición, se aisló e identifico un nuevo nor-friedelano denominado glaucacetalina D (GD) con rendimientos de 2.9 mg/L . Un compuesto novedoso no reportado en cultivos de raíces transformadas, ni en la planta silvestre. Los nor-friedelanos GA y GD son excretados al medio de cultivo. Estudios previos han mostrado que el norfriedelano GA en el área intraperitoneal de ratón presentan un efecto sedativo.

Conclusiones. Se seleccionó y estableció por primera vez un cultivo en suspensión de células transformadas genéticamente de *Galphimia glauca*. Se confirmó su transformación genética. El análisis químico permitió aislar e identificar un nuevo compuesto triterpenico (GD). La elucidación estructural de GD permitió presentar elementos en la ruta biosintética de las glaucacetalinas, permitiendo postular la participación de glaucacetalina D, en la vía de síntesis de los nor-secofriedelanos. La producción de GD es el compuesto mayoritario de esta línea.

Bibliografía. 1.- Cardoso-Taketa A, Lozada-Lechuga J, Fragoso-Serrano M, Villarreal ML, Pereda-Miranda R. (2004). Isolation of nor-secofriedelanes from the sedative extracts of *Galphimia glauca*. J Nat Prod 2004; 67: 644-9

2.- Nader BL, Cardoso-Taketa A, Iturriaga G, Pereda-Miranda R, Villarreal ML. (2004). Genetic transformation of *Galphimia glauca* by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of nor-friedelanes. Planta Med; 70:1174-79.

3.- Bonhomme V, Lavrain-Mattar D, Lacoux J, Fliniaux M, Jacquin-Dubreuil A. (2000). Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rol A, B, C, genes only. J Biotechnol; 81:151-8.

Agradecimientos. CONACyT (80980). (PIFI-IPN).