



## PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CULTIVO CELULAR DE *IBERVILLEA SONORAE*

Galarza-Ramírez Elena-Esmeralda, Arciniega-Carreón Ilse-Yazmín, Ramírez-Sotelo María-Guadalupe<sup>a</sup>, Oliver-Salvador María del Carmen<sup>b</sup>

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI-IPN). Av. Acueducto s/n, col. La Lagunilla Ticomán.

México D.F. Tel: (55) -57-29-6000-ext-56471 y 56465 email: oliveripn@hotmail.com<sup>a</sup>; gramirez55120@gmail.com<sup>b</sup>

### RESUMEN

La *Ibervillea sonora* Greene (*I. sonora*) es una planta de la familia de las curcubitáceas, con una distribución geográfica del norte de México, principalmente de Sonora, Sinaloa y Baja California. Es una especie considerada en peligro de extinción debido a la gran demanda y uso descontrolado de la raíz para el control de la Diabetes Mellitus Tipo II. Investigaciones recientes han propuesto que el efecto hipoglucemiante se debe al contenido de ácidos grasos presentes en la raíz. Por lo que es importante utilizar técnicas como el cultivo *in vitro* para producir y obtener compuestos de interés como los ácidos grasos. En este trabajo, se evaluó el crecimiento celular en suspensiones a partir de tejido calloso empleando tallos como explantes. Así mismo, se evaluó la producción de los ácidos grasos durante los 28 días de cultivo de dos diferentes medios de cultivo MS2 (0.5 mg/L CIN, 1.5 mg/L 2,4-D) y MS4 (0.5 mg/L BAP, 0.5 mg/L 2,4-D). Obteniéndose una tasa de crecimiento alta en MS2 de 0.0794 mg/mL al día, en comparación con MS4 de y 0.0352 mg/mL. Sin embargo, este último se obtuvo una producción mayor de ácidos grasos siendo de 18.78 g/L a los 28 días.

### 1.- INTRODUCCIÓN

La *Ibervillea sonora* Greene (*I. sonora*) es una planta dioica perenne conocida como wereke o guareke, choya-huani, melón de coyote (Figura 1), perteneciente a la familia de las *cucurbitáceas*. Está distribuida en las zonas semiáridas de Sonora, Sinaloa y Baja California. La raíz es tuberculosa y puede llegar a pesar hasta ocho kilos [1]. Ha sido empleada por varios grupos étnicos como Mayo, Opata, Seri y Yaqui como medicina. Las hojas se usan para el tratamiento de enfermedades de la piel, úlceras de estómago, y la raíz es útil para el tratamiento externo de daños dermatológicos, reumatismo así como para contrarrestar la Diabetes Mellitus (DM) [2, 4, 7]. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que *I. sonora* tiene actividad hipoglucemiante, antitumoral y antioxidante [13]. Se ha demostrado que para ejercer el efecto hipoglucémico necesita la presencia de insulina, mostrándose el efecto en ratas con diabetes moderada administradas por vía intraperitoneal (IP), por lo que solo es útil para el control de la DM Tipo II [2, 3, 17].



Figura 1. *Ibervillea sonora* Greene



La Biotecnología permite realizar un control de las condiciones de cultivo de células influyendo en la producción de metabolitos secundarios, siendo una mejor alternativa para la producción de estos [10]. Por lo que se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento; Cinetina (CIN), 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en los cultivos celulares de *I. sonorae* como una alternativa para evitar su explotación y extinción, evaluando la producción de los ácidos grasos.

## 2.- TEORÍA

De acuerdo Hernández et al. (2007) atribuyeron la propiedad hipoglucemiante a la mezcla de monoglicéridos y de ácidos grasos aislados de esta raíz obtenidos por diclorometano. Los estudios realizados por Estrada Zúñiga *et al.* (2012), evaluaron el contenido de los ácidos grasos de cultivos *in vitro*, donde la producción de ácidos grasos tiene una relación directa con el crecimiento. Se conoce que los ácidos grasos tienen una estrecha relación con la hipoglucemia debido a los defectos de la  $\beta$ -oxidación de los mismos. Así mismo, se conoce que los ácidos grasos libres producen resistencia a la insulina afectando así el estímulo de la glucosa [5, 14].

## 3.- PARTE EXPERIMENTAL

Establecimiento de cultivos de *I. sonorae*.

El cultivo de callos de *I. sonorae* se realizó a partir de explantes de tallo en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con Sacarosa 30 g/L, vitaminas MS, Ácido Ascórbico 150 mg/L, ajustadas a un pH 5.8 y agar 6 g/L. Con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 oscuridad y con intensidad luminosa de Se emplearon dos formulaciones del medio de cultivo MS con diferentes reguladores de crecimiento vegetal: MS2 (CIN 0.5mg/mL y 2,4-D 1.5 mg/mL) y MS4 (BAP 0.5 mg/mL, 2,4-D 1 mg/mL).

Establecimiento de cultivos de células de *I. sonorae*.

El cultivo de células en suspensión de *I. sonorae* se realizó con  $5 \pm 0.5$  g de callos friables (del cultivo anterior) y vigorosos de 20 días de cultivo, suspendidos en 25 mL de medio MS con la misma composición que el medio indicado arriba. Estos cultivos se mantuvieron de 120 -150 rpm, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h de oscuridad (intensidad luminosa xxx). Una vez dispersadas las células, se centrifugaron a 3000 rpm, y se inocularon de  $25 \pm 5$  g de células en 200 mL de medio MS y se mantuvieron durante 28 días en las mismas condiciones descritas, tomando muestra cada 3-5 días.

Determinación de ácidos grasos.

Se empleó el método fluorimétrico de Wei-Chen et al., (2009) modificado para determinar ácidos grasos en los cultivos celulares. A los cultivos de 28 días, se les determinó el contenido de ácidos grasos: muestras de 160 $\mu\text{L}$  de cada medio, MS2 y MS4, se les adicionó 160 $\mu\text{L}$  de DMSO al 25% y 4  $\mu\text{L}$  de rojo de Nilo  $\mu\text{L}$  de rojo de Nilo ((9-8diethyl amino) benzo [ $\alpha$ ] phenoxazin-5(5H)-one). Esta mezcla se agitó e incubó 10 minutos a  $40^\circ\text{C}$ ; posteriormente se le añadió 1600 $\mu\text{L}$  de agua destilada. Después de 1 minuto se tomó lectura en un fluorómetro Jenway 6280 a 486 nm de excitación y 570 nm de emisión. Para calcular la concentración de mg ácidos grasos se usó una curva tipo de Trioleína. Las determinaciones se realizaron de aproximadamente cada 4 días de los cultivos en suspensión.



#### 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de cultivos celulares de *I. sonorae*.

Luego de 28 días de cultivo, los cultivos celulares de *I. sonorae* a partir de tallos presentaron una tasa de crecimiento de 0.0794 y 0.0352 mg/mL por día para MS2 y MS4, respectivamente. Por lo que se observó que empleando CIN y 2,4-D se tiene un mayor crecimiento, obteniéndose que a una concentración alta de la auxina (2,4-D) favorece el crecimiento celular. El crecimiento de las células depende de las concentraciones de auxina, donde 2,4-D es un buen regulador para la inducción y el mantenimiento de las células en suspensión [9]. Con el medio de cultivo MS4, que es suplementado con BAP no tiene un buen crecimiento para el cultivo celular debido a la baja concentración de 2,4-D. Sin embargo, en investigaciones previas de este grupo se ha demostrado que BAP favorece la inducción y crecimiento de callos a diferencia de CIN, observándose también que a concentraciones mayores/iguales a 1 mg/mL tanto de CIN como BAP pueden inhibir el crecimiento celular. De acuerdo con Pérez Molphe et al. (1999) y J. Finer (1994), la inducción de callos depende de la concentración de auxinas y citocininas, además de que determina la dirección del metabolismo celular. Se ha observado que el crecimiento del tejido calloso obtenido a partir de tallo de *I. sonorae* es mayor a diferencia de los obtenidos en raíz, empleando el medio de Gamborg, 1968 (B5) y reguladores de crecimiento como Ácido  $\alpha$ -naftalenacético (NAA), 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido 3- indoacético (IAA), datos aún no publicados.

Determinación de ácidos grasos.

Se midió la concentración de lípidos neutros excretados al medio a lo largo del crecimiento celular por el método fluorimétrico de Wei-Chen et al., (2009) modificado. La producción de ácidos grasos a los 28 días está asociado al crecimiento de los cultivos de células de *I. sonorae* (Figura 1 y 2), donde la producción fue de: 12.82 g/L y 18.78 g/L para MS2 y MS4, respectivamente. Estrada Zúñiga et al. (2012), evaluaron el contenido de los ácidos grasos en callos de explantes de hojas a los 7 días de incubación con CIN (1 mg/L) y 2,4-D (1.5 mg/L) obteniendo una producción de ácidos grasos de 48.57 mg/g, encontrándose el ácido palmítico en mayor concentración. En el medio MS4 empleando 0.5 mg/L BAP y 0.5 mg/L 2,4-D, se incrementó la producción de ácidos grasos, a diferencia de MS2 donde se había obtenido una mejor tasa de crecimiento, sin embargo, esto no sucede para tener una mejor producción de ácidos grasos, esto se debe a la diferente concentración empleada de los reguladores así como el tipo de citocinina que fue empleada. Por lo la productividad y el rendimiento de los metabolitos secundarios que son producidos en cultivos *in vitro* de células vegetales, son diferentes a los que se han encontrado en plantas que crecen en condiciones naturales [12,15].

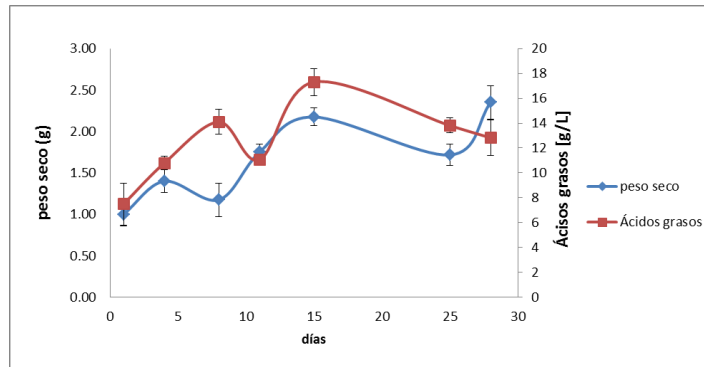


Figura 1. Concentración de ácidos grasos en función de la edad del cultivo celular durante 28 días de crecimiento de *I. sonorae* con el medio MS2 (0.5 mg/L CIN, 1.5 mg/L 2,4-D) por la técnica de rojo de Nilo.

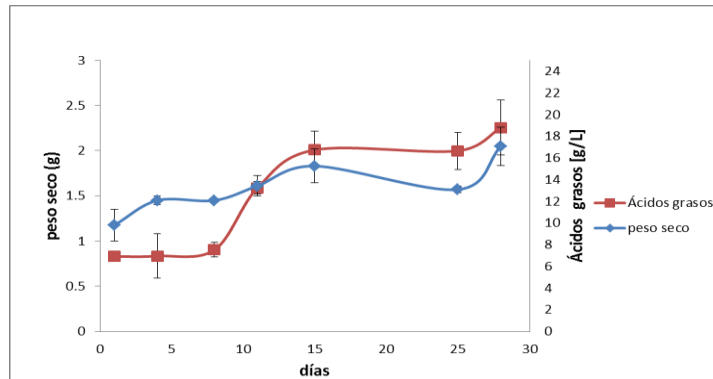


Figura 2. Concentración de ácidos grasos en función de la edad del cultivo celular durante 28 días de crecimiento de *I. sonorae* con el medio MS4 (0.5 mg/L BAP, 0.5 mg/L 2,4-D) por la técnica de rojo de Nilo.

#### 4. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados experimentales: se logró el establecimiento de los cultivos celulares de *I. sonorae*, teniendo una buena tasa de crecimiento con el medio MS2 con una concentración de 1.5 mg/mL de 2,4-D, siendo esta de 0.0794 mg/mL al día. La concentración que más favoreció la producción de ácidos grasos de los cultivos celulares de *I. sonorae* fue en el medio MS4, con 18.78 g/L a los 28 días de cultivo celular empleando BAP y 2,4-D como reguladores.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar Conteras A., Celso Fantini A., Martínez Balleste A. (2006). Riquezas del bosque: frutas, remedios y artesanías de America Latina. Chap. 3. Semilla, raíces y cogollos. Xolalpa Molina S. y Aguilar Contreras A., Edited by López C, Shanley P., Cronkleton MC. El Pais Publications. Bolivia. 102-105.
2. Alarcón-Aguilar, F.J., Campos-Sepúlveda, A. E., Xolalpa-Molina, S., Hernández-Galicia, E., Ramón-Ramos, R. (2002). Hypoglycemic activity of *Ibervillea sonora* roots in healthy and diabetic mice and rats. *Pharmaceutical Biology* 40:570-575.
3. Alarcón-Aguilar, F.J., Calzada-Bermejo, F., Hernández-Galicia, E., Ruíz-Ángeles, C., Román-Ramos, R. (2005) Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* root extracts-II. *Journal of Ethnopharmacology* 97:447-452.
4. Banderas-Dorantes, T.R., Román-Ramos, R., Zamilpa, A., García-Macedo, R., Díaz, M., Campos, M.G., Tortoriello, J., Alarcón-Aguilar, F.J. (2012). Influence of two hypoglycemic Curcubitaceae (*Curcubitaficifolia* Bouché and *Ibervillea sonora* Greene) on ATP-sensitive potassium channels in rat aortic rings. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11(6):510-519
5. Durruty A. P., García de los Ríos A. (2001). Glucotoxicidad y lipotoxicidad: factores en la patogénesis y evolución de la diabetes tipo 2. *Rev. Méd. Chile*. 129(6).
6. Estrada-Zuñiga, M.E., Arano-Varela, H., Buendía-González. L., Orozco-Villafuerte J. (2012). Fatty acids, phenols content, and antioxidant activity in *Ibervillea sonora* callus cultures. *Rev Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1):89-96.
7. Hernández-Díaz, A. F. (2011). Producción de extractos de *Ibervillea sonora* y su evaluación biológica *in vitro* e *in vivo*. Tesis, UPIBI-IPN. 1-68.
8. Hernández-Galicia E., Calzada, F., Román-Ramos, R., Alarcón-Aguilar F.J. (2007). Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonora* root: isolation and hypoglycemic activity. *Plant Med*. 73: 1-5.
9. J. Finer John (1994). Cap. 5. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In: R. A. Dixon and R. A. Gonzales. *Plant cell culture, a Practical Approach*. Second Edition. Oxford. New York, USA, pp 1-
10. Loyola-Vargas y Vazquez-Flota. (2006). *Plant cell culture protocols*. Second Edition. New Jersey. Humana Press.
11. Pérez-Morphe, E.M, Ramírez-Malagón, R., Nuñez-Plenus H.P., Ochoa-Alejo, N. (1999). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Primera Edición. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Páginas 7-179.
12. Phillipson, G. (1999). Plants as a Sources of Valuable Products. In: Charlwood, B.V. and M.J.C. *Secondary Products from Plant Tissue Culture*. Clarendon Press. Oxford. New York. USA, pp 1-288.
13. Nevárez-Ramírez, A. (2014). Evaluación de la actividad anti-tumoral y anti-inflamatoria de *Ibervillea sonora*. Tesis, UPIBI-IPN. 1-114.
14. Randle P. J., Garland P. B., Hales C. N. y Newsholme E. A. (1963). The Glucose Fatty-Acid Cycle. Its Role in Insulin sensitivity and the Metabolic Disturbances of Diabetes Mellitus. *The Lancet*. 785-9.
15. Trejo-Tapia, G., Rodríguez-Monroy, M. (2007). La agregación celular en la producción de Metabolitos Secundarios en Cultivos Vegetales *in vitro*. *Interciencia*, 32 (10): 669-674.



16. Wei-Chen, Chengwu-Zhang, Lirong-Song, Milton-Sommerfeld, Qiang-Hu (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods* 77: 41-47.
17. Zapata-Bustos, R., Alonso-Castro, Á. J., Gómez-Sánchez M., Salazar-Olivo L. A. (2014). *Ibervillea sonora* (Cucurbitaceae) induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a P13K-independent pathway. *J.Ethnopharmacology*. 152:546-552.