



PRODUCCIÓN DE 2,7' CICLOLIGNANOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Hyptis suaveolens*.

Crescencio Bazaldúa^{1,2}, Alexandre Cardoso-Taketa², Jesús Arellano¹, Brenda Camacho-Díaz¹, Elsa Ventura-Zapata¹, María Luisa Villarreal². ¹Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN, Yauatepec, Mor., C.P. 62731. ²Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM, Cuernavaca, Mor., C.P. 62209. cbazaldua@ipn.mx

Podofilotoxina, Raíces transformadas, HPTLC.

Introducción. *Hyptis suaveolens* es un arbusto silvestre utilizado en el México prehispánico en la alimentación y como medicamento para tratar varias enfermedades.⁽¹⁾ En esta especie recientemente se reportó la producción de podofilotoxina (PTOX),⁽²⁾ la cual constituye un 2,7'-ciclolignano utilizado en la semisíntesis de medicamentos anticancerígenos como Etoposido, Teniposido y Etopophos.⁽³⁾ Asimismo, se ha reportado el efecto de la adición de fitohormonas en la producción de PTOX en plántulas de *H. suaveolens* cultivadas *in vitro* ⁽⁴⁾ y la obtención de análogos de PTOX en cultivos de raíces transformadas.⁽⁵⁾

El objetivo de este trabajo fue establecer cultivos de raíces hiperproductoras de PTOX y/o de análogos citotóxicos.

Metodología. Las plántulas utilizadas como fuentes de explantes se obtuvieron a partir de semillas germinadas *in vitro*. Para inducir raíces transformadas se infectaron segmentos internodales con tres cepas de *Agrobacterium rhizogenes*. ⁽⁵⁾ La extracción de 2,7'-ciclolignanos se realizó con metanol-diclorometano-agua (MDA), ⁽⁶⁾ o con cloroformo. La identificación preliminar de PTOX se realizó mediante HPTLC. ⁽⁷⁾ En la identificación cromatográfica por HPLC se utilizó una elución isocrática (acetonitrilo-agua-ac. fórmico, 35:65:0.2 v/v/v). La citotoxicidad se determinó mediante el método de la sulforodamina B cuantificando la Cl_{50} en tres líneas celulares de carcinomas humanos: colon (HF6), cérvico uterino (SIHa) y próstata (PC3).

Resultados. Se seleccionaron 11 líneas de raíces transformadas, de las cuales 4 expresan la proteína verde fluorescente y 7 la Treonina Desaminasa del Tomate (TDT) (figura 1).

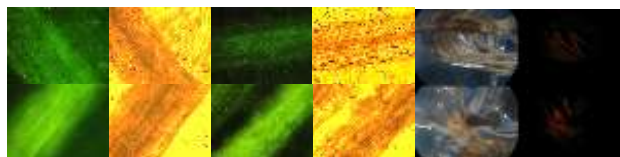


Figura 1. Raíces transformadas de *H. suaveolens* expresando la fluorescencia en verde (GFP) o en rojo (TDT)

Mediante HPTLC se obtuvieron bandas con el mismo RF de PTOX, pero con diferente absorbancia (figura 2 a,b y c), y mediante HPLC se observaron picos con tiempos de retención y espectro de máxima absorción similares al de PTOX (figura 2 d y e). Los extractos más citotóxicos correspondieron al extracto clorofórmico de la línea 10 y al

extracto MDA de la línea 9 que fueron activos sobre los carcinomas SIHa y HF6 (respectivamente) (tabla 1).

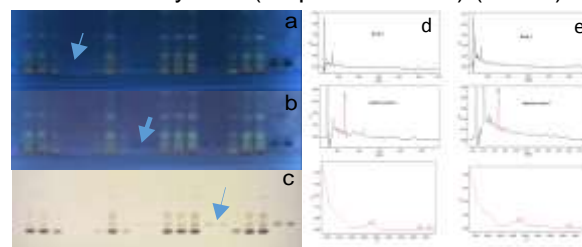


Figura 2. Cromatogramas en HPTLC de extractos de raíces transformadas expresando GFP, las flechas indican la banda de PTOX; a y b) Luz UV 366 y 254nm respectivamente, c) Luz blanca reflejada y transmitida; y en HPLC se observan picos con tiempo de retención similar al de PTOX (d y e).

Tabla 1. Valores de Cl_{50} determinados mediante SRB.

Línea	EXTRACCIÓN MeOH- Dicloro			EXTRACCIÓN Cloroformo			
	HF6	SIHa	PC3	Línea	HF6	SIHa	PC3
1	5.9158	<20 (20.6033)	<20	1C	6.4937	17.4847	<20
2	6.6934	<20 (20.2052)	<20	2C	3.2596	<20	5.4895
3	7.157	<20 (21.0238)	<20	3C	12.1916	6.6973	<20
4	11.7925	<20 (22.8623)	<20	4C	10.9351	6.1723	<20
6	5.5897	<20 (34.137)	<20 (20.3563)	6C	15.7026	6.3106	<20
7	7.707	12.2561	18.3661	7C	14.2772	16.4115	8.6917
9	2.8712	13.5417	9.3703	9C	5.1267	9.0687	16.4948
10	5.9242	7.1401	7.2588	10C	8.2473	1.8441	<20 (20.9)
11	18.0385	<20 (29.2887)	<20	11C	<20 (21.995)	9.6949	<20
14	9.0924	16.8518	10.8536	14C	9.1439	4.1131	<20

Valores de Cl_{50} < 20 μ g/mL representan una buena actividad citotóxica

Conclusiones. Las raíces transformadas de *H. suaveolens* producen al menos un compuesto citotóxico, que en función de los resultados (RF de la banda, TR del pico y Cl_{50}), pudiera ser un análogo de PTOX.

Agradecimiento. Al Instituto Politécnico Nacional por la beca de exclusividad. Este proyecto contó con financiamiento del CONACYT, Proyecto de Ciencia Básica 80980.

Bibliografía.

- Vergara SM, Madrigal ALV, Lemus JS. (2008) *Patente Núm. 264267 IMPI – México*;
- Leander K, and Rosen B. 1988. Medicinal uses for podophyllotoxin. *U. S. Patent* 4,788,216;
- Lautié, E., Quintero, R., Fliniaux, M-A., Villarreal, M-L. (2008). *J Ethnopharm* 402-412;
- Velóz RA, Cardoso-Taketa A, Villarreal ML (2013). *Phcog Res* 5(2): 93-102.
- Bazaldúa C, Cardoso-Taketa A, Arellano J, Camacho-Díaz B, Ventura-Zapata E, Villarreal ML. 2014. *J Chem, Biol and PhysSciSection E* Vol. 4 (5): 37-47.
- Koulman A, Kubbinga ME, Batterman S, Woerdenbag HJ, Pras N, Woolley JG, Quax WJ. 2003. *Planta Med*; 69: 733-738.
- Kamal A, Singh M, Ahmad FJ, Saleem K, Ahmad S. 2013. *Arabian Journal of Chemistry* in press.