



PRODUCCION DE ALCALOIDES OXINDOLICOS EN AGREGADOS CELULARES DE *Uncaria tomentosa*

Gabriela Trejo^{1,2}, Carlos Cerda³, Ana Ramos¹ y Mario Rodríguez²

¹Depto. Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. ²Depto. Biotecnología. CEPROBI-IPN. ³Depto. Química. CINVESTAV-IPN. ¹Av. Instituto Politécnico Nacional 2508. San Pedro Zacatenco. México, D. F. 07360. Fax: (55) 50613313. gttapia@ipn.mx.

Palabras clave: agregación, alcaloides oxindólicos, *Uncaria tomentosa*.

Introducción. El cultivo *in vitro* de *Uncaria tomentosa* (*Ut*) (Rubiácea; uña de gato) representa una alternativa biotecnológica para la producción de alcaloides oxindólicos monoterpénicos (AOM) con actividad farmacológica (1). En las plantas, la biosíntesis de alcaloides, como la de otros metabolitos secundarios, se relaciona con la diferenciación celular. Una característica de la diferenciación de las suspensiones celulares puede ser el desarrollo de agregados celulares más grandes y compactos. Al respecto, Hoekstra (2) reportó que agregados de *Cinchona ledgeriana* de 3-6 mm de diám. producen quinina y quinidina. Asimismo, agregados de *Catharanthus roseus* de 3-7 mm producen 2 veces más alcaloides que suspensiones finas (3).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue inducir en las suspensiones celulares de *U. tomentosa* la formación de agregados y evaluar su capacidad para producir AOM en comparación a suspensiones finas.

Metodología. A partir de una suspensión fina verde (SFina) de *Ut* (agregados de diám.<0.5 mm) subcultivada en medio MS con 2,4-D/KIN (C) en luz continua (150 µmol/m²s), se indujeron agregados >5 mm manipulando componentes del medio de cultivo. Como factores de inducción se probaron: 1) sustitución de 2,4-D por ANA; 2) sustitución de KIN por BAP y 3) aumento de KNO₃. El cuadro 1 resume los medios de cultivo probados. Los agregados de >5 mm se seleccionaron con tamices y se subcultivaron cada 14 días. Después de 20 subcultivos, se evaluaron sus características (friables o compactos), tamaño y AOM por rHPLC (1).

Resultados y discusión. La transferencia de SFina a los medios: 2, 2N, 3 y 3N (con ANA) provocó la oxidación y muerte de las células por lo que se descartaron (cuadro 1). En los medios 1N, 4 y 4N se desarrollaron agregados verdes de 2-3 mm diám., a partir del 4° subcultivo. En el medio 4 (2,4-D/BAP), los agregados fueron compactos en comparación a los formados en 1N y 4N, que fueron friables y fácilmente disgregables. Al 6° subcultivo, en el medio 4 se logró establecer una suspensión con agregados compactos de 5 mm-2 cm diám (SAgregada) de color verde. El medio 4 difiere del control (C) en la sustitución de KIN por BAP, lo que sugiere que el aumento en la agregación se debe principalmente al cambio en la citocinina. Este resultado concuerda con lo observado en *Cinchona ledgeriana* (2) y *Catharanthus roseus* (3), en donde el BAP indujo la formación de agregados de 3-7 mm.

Cuadro 1. Efecto del medio de cultivo sobre SFina

	KIN µM	BAP µM	2,4-D µM	ANA µM	KNO ₃ µM	Observaciones
C	10		10		39	Agregados<0.5 mm y friables
1N	10		10		62	Agregados>0.5 mm y friables
2	10			10	39.4	Oxidación y muerte
2N	10			10	62.2	Oxidación y muerte
3		10		10	39.4	Oxidación y muerte
3N		10		10	62.2	Oxidación y muerte
4		10	10		39.4	Agregados >5 mm y compactos
4N		10	10		62.2	Agregados >0.5 mm y friables

La línea celular con agregados (0.5 mm-2 cm) verdes y compactos (SAgregada) acumuló 31 µg AOM/g ps, el 100% en el medio de cultivo. Mientras que SFina (control con KIN) sólo produjo trazas de AOM (cuadro 2).

Cuadro 2. Producción de AOM en agregados celulares de *Ut*

Línea celular	Citocinina	AOM	
		µg/g ps	µg/l
SFina (<0.5 mm) control	KIN	Trazas	Trazas
SFina (<0.5 mm)	BAP	0	0
SAgregada (>5 mm)	BAP	31	125

Para discriminar si la mayor producción de AOM en SAgregada se debió a la agregación y no a la sustitución de KIN por BAP, se cultivó SFina con BAP (por 2 subcultivos) y no hubo producción de AOM (cuadro 2). Por lo anterior, la producción de AOM en SAgregada es atribuible al desarrollo de agregados diferenciados (>tamaño y compactos) de *Ut* y no al cambio en el regulador de crecimiento.

Conclusiones. La sustitución de KIN por BAP indujo el desarrollo de agregados diferenciados de *U. tomentosa*. La diferenciación estuvo relacionada con mayor producción de AOM.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por CONACyT (proyectos 43228 y 43861) y CGPI-IPN (20050058).

Bibliografía.

- Trejo-Tapia, G, Cerda-García-Rojas, C. M., Rodríguez-Monroy, M, Ramos-Valdivia, A. C. (2005). Monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* (Willd)D.C. cell suspension cultures in a stirred tank bioreactor. *Biotechnol. Prog.* DOI:10.1021/bp049608s.
- Hoekstra, S. (1993). Accumulation of indole alkaloids in plant-organ culture. Ph D Thesis. Universidad de Leiden. Holanda.
- Zhao, J., Hu, Q., Guo, Y.Q., Zhu, W.H. (2001) Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthus roseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:693-698.