

## IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LIGNANOS ANÁLOGOS A LA PODOFILOTOXINA EN CULTIVOS *in vitro* DE *Hyptis verticillata*

Miguel Ángel Trujillo Vera<sup>1</sup> Rogelio Pereda Miranda<sup>2</sup> y María Luisa Villarreal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Biotecnología, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.

<sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

*Palabras clave:* Lignanos, podofilotoxina, cultivo de tejidos *Hyptis verticillata*

**Introducción.** La podofilotoxina y compuestos análogos son lignanos que poseen actividades citotóxicas, antineoplásicas y antivirales importantes<sup>1</sup>. La podofilotoxina es un lignano altamente citotóxico que constituye el medicamento de elección para el tratamiento de condilomas causados por el virus del papiloma humano, y es efectivo en el tratamiento del tumor de Wilms, diferentes tipos de tumores genitales, linfomas y cáncer de pulmón. Existe un gran interés por identificar fuentes naturales alternas para la obtención y producción de podofilotoxina.

La planta medicinal *Hyptis verticillata* (Lamiaceae), nativa de México, produce podofilotoxina y análogos que podrían ser utilizados como materia prima para el desarrollo de agentes antineoplásicos. Dado la capacidad demostrada de algunas especies vegetales para producir lignanos utilizando sistemas *in vitro*<sup>2</sup>, en el presente proyecto se iniciaron cultivos de plántulas y callos de *H. verticillata* con el propósito de desarrollar sistemas capaces de biosintetizar podofilotoxina y otros lignanos bioactivos.

**Metodología.** Se obtuvieron explantes a partir de extremos apicales de plantas de *H. verticillata* colectadas en la comunidad de "Atlaltipa Mirador", Atlapexco Hidalgo, en el distrito de Huejutla, Hidalgo. Se desinfectaron con cloro y alcohol (alcohol al 70 %, cloro (Cloralex) al 15%, 10% y 5 %). Para inducir la formación de callos, los explantes de cortes de tallos y hojas enteras se cultivaron en medio de cultivo MS, en 44 diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetales que incluyeron: 2,4-D, ANA, CIN, BAP. La identificación y cuantificación de lignanos se realizó por cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). Se determinó la citotoxicidad (CE<sub>50</sub>) de los cultivos frente a un modelo celular de carcinoma nasofaríngeo humano (KB).

### Resultados y discusión.

A través de subcultivos sucesivos de cortes de plántulas se obtuvieron un total de 254 clonas en un periodo de 6 meses. Los resultados indican que se obtuvo una respuesta positiva de inducción de callos del 61 % de los tratamientos. Las combinaciones hormonales que indujeron 100 % de callos con explantes de tallos fueron: 2,4-D/CIN (0.5/0.5 mg/l), ANA/BAP (1/0.5 mg/l, 2/0.5 mg/l). Las combinaciones hormonales que indujeron 100% de callos con explantes de hojas fueron: 2,4-D (1mg/l), 2,4-D/CIN (0.5/0.1 mg/l), 2,4-D/CIN (1/0.1 mg/l), 2,4-D/CIN (0.5/0.5 mg/l), 2,4-D/BAP (1/0.1 mg/l), 2,4-D/BAP (2/0.1 mg/l), 2,4-D/BAP (1/0.5 mg/l). Se obtuvo un 60% de callos friables con posible potencial para iniciar cultivos en suspensión. En forma

general, los cortes de tallos fueron los mejores explantes para la callogénesis. Se identificó la presencia de podofilotoxina en los cultivos de plántulas establecidas *in vitro* utilizando CLAE (Fig.2).

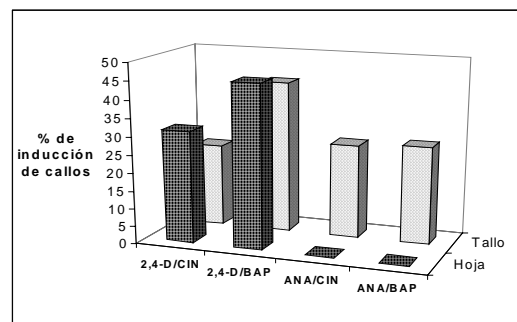


Fig. 1. Inducción de callos por grupo de hormonas.

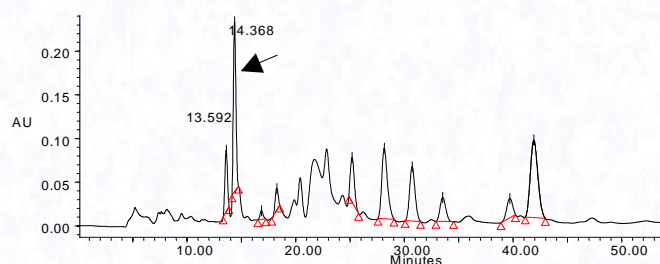


Fig. 2. Coelución de extracto de plántulas y el estándar de podofilotoxina. La flecha indica el tiempo de retención de la podofilotoxina.

**Conclusiones.** Por primera vez se establecieron cultivos *in vitro* de la especie *H. verticillata* productora de podofilotoxina, en medio MS adicionando diferentes combinaciones hormonales. Además se logró identificar podofilotoxina en plántulas establecidas *in vitro*. Los análisis para determinar la acumulación de este metabolito, así como la identificación de otros lignanos presentes en los cultivos, están actualmente en proceso. Los resultados de las pruebas de citotoxicidad mostraron valores altamente significativos de CE<sub>50</sub> para el extracto de plántulas establecidas *in vitro*, 0.1 µg/ml, y para el extracto de la planta silvestre. < 0.1 µg/ml.

### Bibliografía.

- Dewick PM. (2001). Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. John Wiley & Sons Ltd.U.K. 2ª Edición. p. 130-135.
- Mohagheghzadeh A., Schmith TJ. y Alferman W. (2001). Arylnaphthalene lignans from *in vitro* cultures of *Linum austriacum*. *J. Nat. Prod.* 65: 69-71.