

CINETICA DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN DE LA LÍNEA CELULAR PCCA-A DE *Camptotheca acuminata*

José Angeles Chimal¹, Ma. Luisa Villarreal Ortega¹, Rodolfo Quintero Ramírez¹, Rogelio Pereda-Miranda² y Argelia Lorence¹ Quiñones. ¹Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, CP 62210. Cuernavaca, Morelos. México. Tel (73) 297057, Fax (73) 297030. ²Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma del México. E-mail: chimal@cib.uaem.mx

Palabras clave: *cultivos en suspensión, Camptotheca acuminata, camptotecina, metabolitos secundarios de plantas*

Introducción: *Camptotheca acuminata* es una especie arbórea que crece naturalmente en el sureste de China. Tradicionalmente, de la corteza de *C. acuminata*, se extrae un alcaloide monoterpénico, la camptotecina (CPT). Este compuesto posee una importante actividad antineoplásica, antiparasitaria y antiretroviral (Wall, 1998). La CPT, tiene efecto inhibitorio sobre la topoisomerasa tipo I (Topo I) de mamíferos por su capacidad de relajar el ácido desoxirribonucleico (Hsiang *et al.*, 1985). A la fecha, solamente dos derivados semisintéticos de la CPT, el Hycamtin ("Topotecan", SmithKline & Beecham, Philadelphia, PA) y el Camptosar ("Irinotecan", Pharmacia & UpJohn, Inc., Kalamazoo, MI) han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de neoplasias de ovario y de colon, respectivamente. En diversos grupos de investigación existe interés en obtener CPT a partir de otras alternativas biotecnológicas, como el cultivo de tejidos vegetales.

Objetivo: Establecer cultivos en suspensión de *Camptotheca acuminata* con capacidad de producción de camptotecina (CPT).

Metodología: Las líneas celulares derivadas de callos de *C. acuminata* fueron proporcionadas por Phyton Inc. (Ithaca, NY). Éstos fueron subcultivados en frascos con medio de cultivo sólido NTM20. Para evitar la formación de fenoles, al medio de cultivo original se le agregó agua de coco filtrada, ácido ascórbico y L-cisteína como anitoxidantes. Cuando la consistencia de los callos alcanzó una friabilidad adecuada, fueron transferidos a matraces erlenmayer de 250 mL con medio de cultivo líquido NTM20, y antioxidantes. Se colocaron en una agitadora orbital a 100 rpm, a temperatura constante de 25 °C, en oscuridad. Se subcultivaron cada 20 días, seleccionando aquellas suspensiones celulares que presentaron mayor homogeneidad, sin agregados. A partir de estos cultivos y con un inóculo del 10% v/v se estableció la cinética de crecimiento, con medición de variables cada tercer día, con tres repeticiones. Se determinó el peso fresco por filtración de cada muestra. El peso seco se obtuvo liofilizando el tejido filtrado. En el sobrenadante se determinó el pH. La concentración de CPT fue cuantificada por HPLC, utilizando un sistema de elución de 70 y 30% de agua y acetonitrilo respectivamente (van Hengel *et al.*, 1992), a una absorbancia de 256 nm y con un flujo de 0.6 mL/min (Pereda, 2000). La concentración de carbohidratos (glucosa, fructosa y

sacarosa) fue realizada por HPLC utilizando un detector de índice de refracción (W410).

Resultados: El incremento en la biomasa, cuantificada en peso seco (g/L), permitió observar una fase *lag* de tres días, a partir del cual se disparó la fase exponencial hasta el 15^{avo} día de cultivo. A partir de éste, la fase estacionaria se mantuvo constante, con una ligera pérdida en biomasa hasta el día 42. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.1337 d⁻¹. Se obtuvo un rendimiento máximo de biomasa de 17.65 g/L, correspondiente al día 18 de cultivo. De acuerdo al consumo de carbohidratos, se observó que la sacarosa fue hidrolizada antes de los seis días del cultivo. El patrón de consumo de la glucosa y la fructosa, mostró una tendencia similar, no apreciándose una preferencia significativa por alguno ellos. A partir del día 21 son consumidos prácticamente en su totalidad. Durante la fase estacionaria del cultivo, se demostró la presencia del metabolito CPT, en las suspensiones de *C. acuminata*.

Conclusiones: Fue posible establecer cultivos de células en suspensión de la línea PCCA-A de *C. acuminata* con capacidad de producción de CPT. Éstos mostraron velocidades específicas de crecimiento típicas de otros cultivos vegetales. El rendimiento en biomasa corresponde a los valores usualmente reportados en la literatura.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto J29064-B. La corporación Phyton Inc. (Ithaca, NY) nos proporcionó las líneas celulares de *C. acuminata*.

Bibliografía:

- Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S. y Liu, L. F. 1985. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 260: 14873-14878.
- Pereda, M. R. 2000. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Comunicación personal.
- van Hengel, A.J., .P. Harkes, H.J. Wichers, P.G.M. Hesselink y R.M. Buitelaar 1992. Characterization of callus formation and camptothecin production by cell lines of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 28: 11-18.
- Wall, M. E. 1998. Camptothecin and taxol: discovery to clinic. Research Triangle Institute. *Med. Res. Rev.* 18: 299-314.