

Producción de alcaloides en cultivos *in vitro* de células de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

N. PÉREZ SOUTO, A. ECHEVARRÍA, A. LAGUNA, J. DEL SOL, N. CASTILLO y P. SIERRA

Laboratorio Metabolitos Secundarios. Biotecnología. CENIC
Apartado 6880, Cubanacán, La Habana, Cuba

Recibido en septiembre de 1986

RESUMEN

Catharanthus roseus (L.) G. Don, es una especie vegetal de gran importancia para la industria farmacéutica, por ser fuente de dos medicamentos antitumorales, la *vincristina* y la *vinblastina*. Estos dos alcaloides indólicos se encuentran en el material vegetal en muy pequeña proporción y su purificación es difícil, lo que los hace muy costosos y justifica así estudios de cultivo de células y tejidos *in vitro*. Se describe la iniciación de callos y suspensiones celulares de esta planta, la obtención de líneas productoras de alcaloides indólicos y la identificación de siete de ellos: ajmalicina, vindolinina, 19-epivindolinina, tetrahydroalstonina, yohimbina, horhammericine y pleiocarpamina, así como se reportan medios de cultivo útiles para crecimiento y producción.

SUMMARY

Catharanthus roseus (L.) G. Don is a vegetal species of great importance to the pharmaceutical industry for being source of antitumor *vinblastine* and *vincristine*. These two indole alkaloids are present in vegetal material in minute amounts and its purification is hard and time consuming. In the present article the initiation of calli and cell suspensions, the obtention of cell strains producing indole alkaloid is reported, as well as the identification of seven of them: ajmalicine, vindolinine, 19-epivindolinine, tetrahydroalstonine, yohimbine, horhammericine, and pleiocarpamine. Useful culture media for growth and production are also reported.

INTRODUCCION

El cultivo *in vitro* de células vegetales, ya sea en medio sólido a nivel de callo, o en medio líquido para suspensiones celulares y fermentadores, es una fuente potencial de sustancias de interés para la industria farmacéutica, presentando todas las ventajas e inconvenientes inherentes a procesos biotecnológicos (Carew D.P., 1965). El empleo de estas técnicas para la obtención de fármacos sólo se justifica en aquellos compuestos extremadamente costosos.

Una de las especies vegetales de mayor interés para estudios *in vivo* o *in vitro* ha sido la vicaria, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, planta de la cual se han aislado e identificado más de 120 alcaloides indólicos, entre ellos varios utilizados como medicamentos para el ser humano.

Los compuestos alcaloidales de mayor importancia obtenidos de esta planta son la vincristina y la vinblastina, que se encuentran en muy pequeña proporción en sus tejidos y en mezclas complejas difíciles de purificar, lo cual hace a estos dos medicamentos antitumorales extremadamente costosos.

Por otra parte, a pesar de largos estudios, la síntesis o semisíntesis de estos compuestos no ha sido lograda aún (Kutney, J. P. *et al.*, 1981). La producción de alcaloides por cultivo de células *in vitro* puede considerarse como un proceso de diferenciación gobernado por las condiciones ambientales (medio de cultivo, fitohormonas, luz, temperatura, precursores, etcétera), y por el genotipo del material cultivado (Lindsey, K., 1983).

La acumulación de alcaloides es un fenómeno complejo, no totalmente desconectado del crecimiento celular, pero difícil de relacionar con la aparición o desaparición de algún metabolito o sustancia en el medio (Merillon, J. M. *et al.*, 1983).

En tanto que las condiciones ambientales que pueden inducir a las células a sintetizar y acumular alcaloides, han sido bastante trabajadas, la selección de un genotipo prometedor aún requiere investigaciones (Kurz, W. G. *et al.*, 1980). Frecuentemente los cultivos de células no expresan el potencial biosintético de la planta intacta; en el caso de *Catharanthus roseus*, mientras la planta produce más de 120 alcaloides indólicos, de sus cultivos celulares *in vitro* se han aislado hasta el momento 38 alcaloides en rendimientos inferiores a la planta *in vivo*. No se han aislado hasta el momento nuevos alcaloides indólicos de los cultivos *in vitro*.

En el presente trabajo reportamos los resultados obtenidos por nuestro grupo en el cultivo de células de *Catharanthus roseus*, la iniciación y crecimiento de callos y suspensiones celulares, la optimización de medios de cultivo, la obtención de líneas de interés y la identificación de alcaloides elaborados *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

El material vegetal empleado en la iniciación de callos celulares procedió de plantas cultivadas en invernadero, sometidas a proceso de esterilización, o de plantas germinadas de semillas en condiciones asépticas. El tejido vegetal fresco fue seccionado y separado en hojas y tallos, lavado con agua, detergente, sumergido 30 segundos en etanol al 70 por ciento y esterilizado con soluciones de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y calcio, o cloruro de mercurio, probando distintos tiempos. El material lavado con agua estéril varias veces, se colocó en medio sólido.

Para la iniciación de callos resultó conveniente el medio de Murashige y Skoog (MS) (Murashige, T. y F. Skoog, 1962) con dos mg por litro de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4D) y 0,1 mg por litro de kinetina (K) solidificado con un 0,8 por ciento de agar bacteriológico. La inducción de callos se realizó en la oscuridad a temperaturas no controladas entre 25-30°C y demoró tres o cuatro semanas. Los callos así obtenidos fueron subcultivados en el mismo medio durante varios pases y posteriormente pasados a medios de experimentación cuya composición basal fue siempre la del medio MS o del medio B5 (Gamborg, O. L., *et al.*, 1968), usándose además fitohormonas como el ácido naftalenacético (NAA), benciladenina (BA), ácido indolbutírico (Ibut). También se probó la adición de 10 por ciento de agua de coco desproteïnizada (Co) ensayándose además distintas concentraciones de triptófano (T) y de sacarosa (S) en los medios.

Las suspensiones celulares se obtuvieron por desagregación en el mismo medio del callo, empleando aproximadamente cinco gramos de callo fresco friable por cada 50 ml de medio líquido. Las suspensiones así iniciadas fueron decantadas y subcultivadas cada 2-3 semanas con un inóculo del 20-25 por ciento. Se empleó zaranda orbital con una pulgada de excentricidad y 120 rpm, la temperatura entre 25-30°C y la iluminación ambiente. El crecimiento se evaluó mediante medición de pH, índice de refracción, peso húmedo y peso seco por liofilización.

El análisis químico de los callos y las células de las suspensiones se realizó de la forma siguiente: el material celular húmedo se extrajo en metanol (25 ml por cada gramo) en baño ultrasónico (barra fija, amplitud dos micrones) durante una hora. Se filtró y repitió la operación. Los filtrados metanólicos se

evaporaron a sequedad a 50°C; el sirope así obtenido se extrajo con ácido tartárico al 2 por ciento (6 x 15 ml) calentando ligeramente para ayudar a la disolución, se filtró, y la solución acuosa ácida se basificó hasta pH 10 con agua de amonio. La solución básica se extrajo con acetato de etilo (5 x 25 ml). La fase orgánica se evaporó y secó sobre sulfato de sodio anhidro. El crudo de alcaloides así obtenido se analizó por cromatografía en capa delgada en sílica gel y por cromatografía líquido-líquido de alta presión (HPLC), en equipo Waters con bomba modelo M-45, inyector U6K con detección UV a 254 nm. La columna empleada fue Lichrosorb RP-18 (4 x 25 cm) de 10 micras tamaño de partícula; como solvente fue utilizada una mezcla de metanol-agua 7:3 con 0,1 por ciento de trietilamina y flujo de un mililitro por minuto. Se coinyectaron patrones para la identificación de los alcaloides.

RESULTADOS Y DISCUSION

Iniciación de callos

Se probaron diferentes medios para la iniciación de callos a partir de hojas, tallos y plántulas recién germinadas. La concentración de sales y vitaminas ensayada fue siempre la correspondiente a los medios MS y B5, probándose las siguientes fitohormonas (entre paréntesis las concentraciones en miligramos por litro ensayadas): 2, 4D (1, 2, 5); NAA (2, 3, 5); K (0,1–0,2); BA (1, 2).

Además se probó extracto de levadura (0,1 por ciento) y agua de coco (10 por ciento). Un medio que encontramos como resultado de nuestro trabajo y reportamos como satisfactorio en cuanto a iniciación de callo y friabilidad fue el MS con dos miligramos por litro de 2, 4D y 0,1 miligramos por litro de kinetina (MS D₂ K_{0,1}). También resultaron convenientes el medio MS D₂ K_{0,1} Co) y el medio B5 D₁. En otros medios con diferentes concentraciones u hormonas la rapidez de iniciación fue menor y la friabilidad variable. Los callos se iniciaron de hojas, tallos y plántulas con similar facilidad a temperaturas entre 25–30°C en la oscuridad.

Crecimiento y producción

Los callos subcultivados entre 5 y 8 veces en MS D₂ K_{0,1} y MS D₂ K_{0,1} Co cada 3–4 semanas presentaron variada morfología a simple vista; algunos tenían apariencia gruesa, poco friables y de color carmelita oscuro variable; otros muy friables, y con zonas verdosas en algunos casos. Estos callos fueron pasados a diferentes medios y la producción de alcaloides desde el punto de vista cualitativo así como el crecimiento fueron evaluados y comparados. Se emplearon combinaciones de medios y fitohormonas que se muestran en la tabla 1. Fueron probados en estas experiencias gran número de callos iniciados de hojas, tallos y plántulas.

Como señalan otros autores (Kourí, J. B. *et al.*, 1984), en cultivos de células vegetales no existen criterios uniformes para caracterizar una línea celular y son importantes el comportamiento estable durante meses de la morfología, fisiología y bioquímica, pues el callo celular es un mosaico genético, y aun en un mismo medio de cultivo pueden ocurrir selecciones y mutaciones de diverso origen (Henke, R. H., 1981).

El criterio fundamental utilizado en este trabajo para caracterizar las líneas celulares fue el patrón alcaloidal obtenido como resultado del análisis cromatográfico de 430 callos y 30 suspensiones celulares, encontrándose diferentes patrones de alcaloides, tanto en tipo de compuesto como en concentraciones relativas; además, una línea celular dada varía su patrón alcaloidal en dependencia del medio y del tiempo a que se efectúa el análisis.

TABLA I
MEDIOS ENSAYADOS A NIVEL DE CALLO CELULAR
PARA CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE ALCALOIDES

B5 D ₁	MSI ₂ K ₁ S ₅₀
B5 D ₁ Co	MSI ₂ K ₁ T ₃ S ₅₀
MS D ₁	MSI ₂ K ₁ T ₆ S ₅₀
MS D ₂ K ₁	MSD ₂ K ₁ T ₃
MSD ₂ K ₁ Co	MSI ₂ BA ₁ T ₃ S ₅₀
MS Co	MSI ₂ BA ₁ T ₆ S ₅₀
MSNAA ₃	MSI ₂ BA ₁ S ₅₀
MSNAA ₂ K ₂	MSI ₂ N ₂ BA ₁ K ₅ T ₃ S ₅₀
MSI ₂ N ₁ BA ₁ K ₅ S ₅₀	

MS—medio de Murashige y Skoog

B5—medio de Gamborg

Los subíndices en las hormonas indican la concentración en miligramos por litro; los subíndices en el triptófano (T) y en la sacarosa (S) están dados en gramos por litro.

El agua de coco desproteinizada se usó al 10 por ciento del volumen total de los medios.

La figura 1 muestra el cromatograma del extracto de alcaloides de la línea 7-3' obtenidos de hojas, relacionándose el medio de crecimiento, las condiciones y los alcaloides identificados.

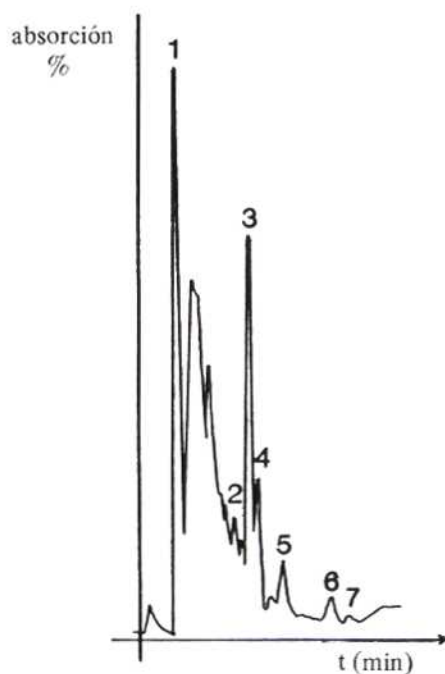


FIG. 1. Cromatograma del extracto total de alcaloides de la línea CR-7-3 en callo. Medio MS I_{0,2} BA₁ T_{0,3} S₅₀, 50 días. Condiciones cromatograficas: Equipo Waters bomba M-45, inyector U6K, detección a 254 nm, columna Lichrosob RP-18, solvente metanol-agua 7:3 con 0,1 por ciento trietilamina, flujo 1 ml por minuto: 1-triptófano, 2-yohimbina, 3-horhammericina, 4-vindolinina, 5-ajmalicina, 6-pleiocarpamina, 7-tetrahydroalstonina.

La figura 2 muestra el cromatograma de la línea 5-7 obtenida a partir de tallos.

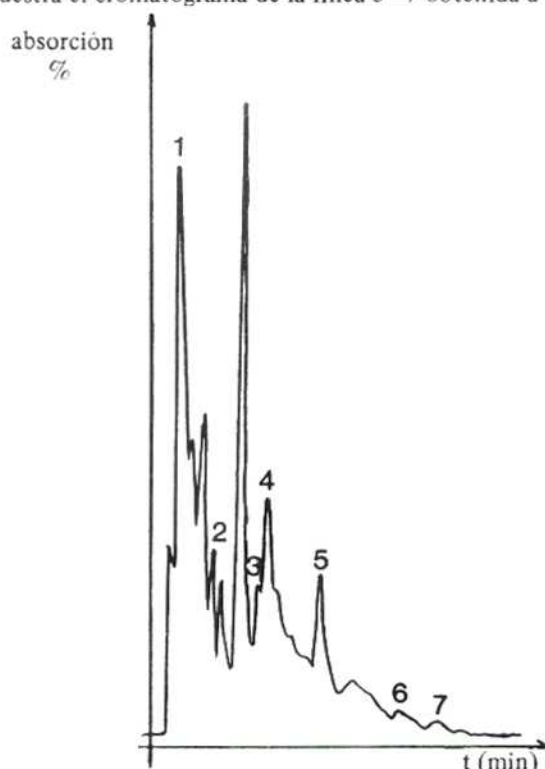


FIG. 2. Cromatograma del extracto total de alcaloides de la línea CR-5-7 en callo. Condiciones cromatográficas idénticas que en la figura 1: 1-triptófano, 2-yohimbina, 3-19-epivindolinina, 4-vindolinina, 5-ajmalicina, 6-pleiocarpamina, 7-tetrahidroalstonina. Medio $MS I_{0,2} BA_1 T_{6,3} S_{50}$.

Teniendo en cuenta los reportes contradictorios acerca del efecto del triptófano en el crecimiento de los callos y la producción de alcaloides (Scott A. I., 1979; Sasse F., 1983), realizamos comparaciones en cinco líneas celulares a nivel de callo, utilizando dos medios básicos que fueron $MSI_{0,2} K_{0,1}$ $MS I_{0,2} BA_1$ sembrándose los callos con tres réplicas en medio sin triptófano, con 0,3 gramos y 0,6 gramos por litro de este precursor de alcaloides. A la mayor concentración de triptófano, tanto el crecimiento como la producción de alcaloides es pobre; los mejores resultados se encontraron a la concentración de 0,3 gramos por litro, aunque es de señalar que la respuesta es específica para cada línea, esto pudiera explicar las discrepancias en la literatura.

Resulta interesante que obtuvimos producción de alcaloides en medios con ácido 2,4-diclorofenoxiacético a pesar de que hay autores que plantean un efecto inhibitorio por esta auxina. Sin duda, son pocas las generalizaciones a hacer en estos aspectos y hay que considerar siempre la variabilidad en la respuesta por diferentes genotipos. Sí se debe destacar que medios que favorecen el crecimiento no son en la mayoría de los casos óptimos para la producción de alcaloides y medios que favorecen un buen patrón de alcaloides ($MSI_{0,2} BA_1 T_{0,3} S_{50}$ y $MSI_{0,2} K_{0,1} T_{0,3} S_{50}$) no propician un buen crecimiento.

Un compromiso adecuado entre crecimiento y producción está aún por alcanzar; una posible opción es el uso sucesivo de medios diferentes.

Suspensiones celulares

A partir de callos con resultados interesantes por su análisis químico, o debido a su alta friabilidad y rápido crecimiento, se iniciaron aproximadamente 30 suspensiones celulares en los siguientes medios: $MSD_2 K_{0,1}$, $MSD_1 Co$, $MSI_{0,2} BA_1 T_{0,3} S_{50}$, $B5D_1$. Al cabo de tres pases se lograron suspensiones de buena apariencia y creciendo en 2,3 y hasta en una semana, con excepción del medio $MSI_{0,2} BA_1 T_{0,3} S_{50}$, en el cual los callos crecen lentamente (dos a tres meses) con poca friabilidad, aspecto granuloso, y se requirió más tiempo para iniciar suspensiones.

Estas suspensiones fueron filtradas y el material vegetal celular fresco analizado químicamente. La inspección del patrón de alcaloides de varias líneas en suspensión muestra que hay líneas produciendo en medios tales como $MSD_2 K_{0,1}$ o $B5D_1$.

La figura 3 muestra el cromatograma del extracto alcaloides de la línea 7-34 (hojas) en medio $MSD_2 K_{0,1}$ en suspensión de 40 días.

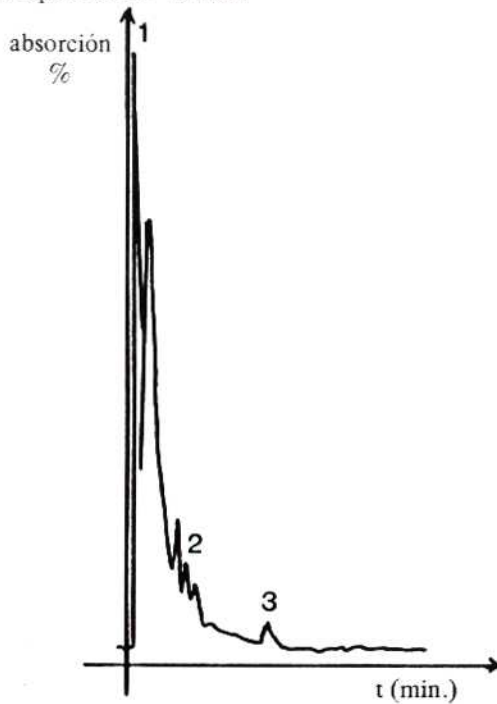


FIG. 3. Cromatograma del extracto total de alcaloides de la línea 7-34 en suspensión de 40 días. Condiciones del cromatograma idénticas que en la figura 1: 1-triptófano, 2-yohimbina, 3-ajmalicina. Medio $MSD_2 K_{0,1}$.

A una línea celular codificada CR-5-7 (tallo) creciendo en suspensión en medio líquido $MSD_2 K_{0,1}$ se le realizó un estudio más detallado. De esta línea se inocularon 40 erlenmeyer con ml de inóculo y 80 ml de medio, se muestreó cada dos días hasta el día 20 de cultivo. A cada muestra (2 erlenmeyer) se le realizó conteo celular, determinación de masa húmeda, masa seca por liofilización, medida del índice de refracción y del pH. También se midió el porcentaje de alcaloides totales contra masa seca y se realizó el análisis por HPLC de los extractos alcaloidales a diferentes tiempos. Se hicieron también observaciones microscópicas.

En la tabla 2 se pueden observar los datos obtenidos como media de los erlenmeyer colectados.

TABLA 2
RESULTADOS DE LA EXPERIENCIA CON LA LINEA CR – 5/7

<i>Día</i>	<i>pH</i>	<i>Peso húmedo (g)</i>	<i>Peso seco (g)</i>	<i>Índice refracción</i>	<i>Conteo celular</i>	<i>Porcentaje de alcaloides</i>
2	5,9	1,13	0,12	1,3412	$0,37 \cdot 10^4$	0,08
4	5,8	8,60	0,19	1,3402	$4,6 \cdot 10^4$	0,10
6	5,5	19,11	0,53	1,3400	$74 \cdot 10^4$	0,16
8	6,2	17,90	1,10	1,3388	$54 \cdot 10^5$	0,21
10	7,2	14,50	1,15	1,3348	$51 \cdot 10^5$	0,30
12	7,4	14,60	1,12	1,3370	$50 \cdot 10^5$	0,34
14	7,5	10,00	1,10	1,3360	$14 \cdot 10^5$	0,36
16	7,5	7,12	0,76	1,3360	$10 \cdot 10^5$	0,43
18	7,4	8,60	0,82	1,3358	$8,2 \cdot 10^5$	0,42
20	7,5	7,81	0,81	1,3360	$9,3 \cdot 10^5$	0,45

Hasta el sexto día del experimento se observó poco crecimiento y duplicación celular, y bajo contenido total de alcaloides; es una etapa de adaptación y se observan con el microscopio células pequeñas y redondeadas características de células meristemáticas en fase de adaptación (foto 1).

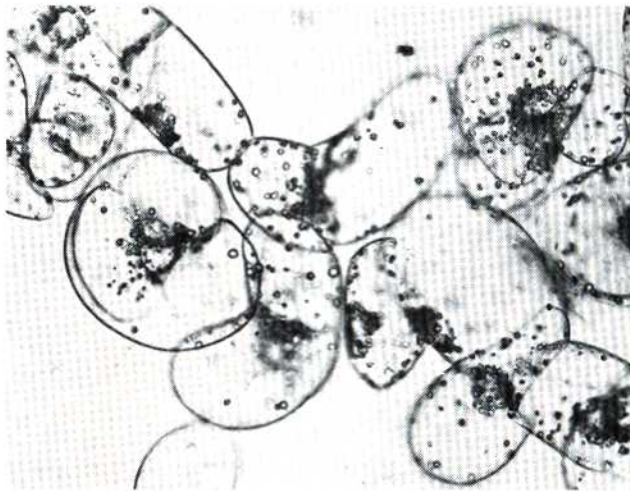


FOTO 1. Células de la línea CR-5-7 en suspensión a los 4 días.

Posteriormente, y hasta el día 14, hay una etapa de división celular activa con aumento del peso seco, del peso húmedo y del número de células. El índice de refracción disminuye con el tiempo, de acuerdo con el consumo de sacarosa fundamentalmente, y el pH oscila de 5,8 a 7,5.

En cuanto a la producción de alcaloides, se llegó al máximo valor a los 16 días, en plena fase estacionaria del crecimiento. Al revisar los cromatogramas se observó que al cuarto día comienza a detectarse el pico correspondiente a la ajmalicina (figura 4) que va aumentando en proporción hasta el día 12. A partir del día 11 ya aparecen señales de otros alcaloides, lo que concuerda con los conocimientos acerca de la biosíntesis de alcaloides indólicos donde la ajmalicina es uno de los primeros alcaloides que se biosintetizan y sirve de punto de partida para la síntesis de otros más complejos.

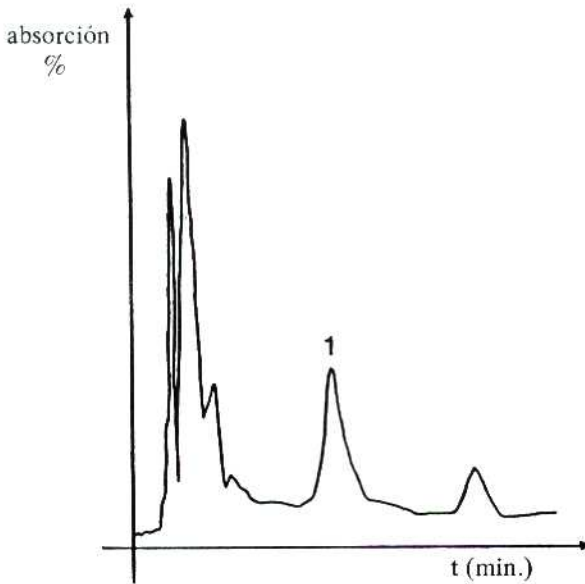


FIG. 4. Cromatograma del extracto total de alcaloides de la línea CR-5-7 en suspensión a los 4 días. Condiciones del cromatograma idénticas que en la figura 1: 1-ajmalicina. Medio de cultivo MS D₂ K_{0,1}.

Como resultado de este trabajo hemos obtenido un grupo de líneas celulares *in vitro* de *Catharanthus roseus* productoras de variados patrones de alcaloides, se han identificado además entre ellos los siguientes: ajmalicina, vindolinina, tetrahydroalstonina, yohimbina, horhammericina, pleiocarpamina y 19-epivindolinina.

También se han obtenido líneas con un pobre patrón de alcaloides, pero con un rápido crecimiento y friabilidad, tanto en callo como en suspensión. Recomendamos continuar la selección de líneas que produzcan los compuestos de más interés, así como la optimización de parámetros para crecimiento y producción, eventos hasta el momento contrapuestos.

REFERENCIAS

- CAREW, D. P. y J. STABA (1965). *Plant tissue culture, its fundamentals, applications and relationship to medicinal plants*. Lloydia 28: 1-26.
- GAMBORG, O. L.; R. A. MILER y K. OJIMA (1968). *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells*. Exp. Cell. Res. 50: 151-158.

- HENKE, R. H. (1981). *Selection of biochemical mutants in plant cell cultures*. Environmental and Experimental Botany 21, 3: 347-357.
- KOURI, J. B.; M. J. MARTINEZ; J. RODRIGUEZ y R. GUTIERREZ (1984). *Obtención y caracterización de la línea celular C-33 de una variedad comercial de caña de azúcar*. Interferón y Biotecnología 1, 2: 25-35.
- KUTNEY, J. P.; B. AWERYN; L. S. CHOI; B. R. WORTH y K. L. STUART (1981). *Studies on Plant tissue culture*. Heterocycles 15: 1405-1431.
- KURZ, W. G. W.; K. B. CHATSON; F. CONSTABEL; J. P. KUTNEY y L. S. CHOI (1980). *Alkaloid production in Catharanthus roseus cell cultures*. Phytochemistry 19: 2583-2587.
- LINDSEY, K. y M. YEOMAN (1983). *The Relationship between Growth Rate, Differentiation and Alkaloid Accumulation in Cell Cultures*. Journal Exp. Botany 34: 1055-1065.
- MERILLON, J. M.; J. C. CHENIEUX y M. RIDFAU (1983). *Time course of growth, evolution of sugar nitrogen metabolism and accumulation of alkaloids in cell suspensions of Catharanthus roseus*. Planta Medica 47: 169-176.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- SAASE, F.; M. BUCHOLZ y J. BERLIN (1983). *Selection of cell lines of Catharanthus roseus with increased tryptophan decarboxylase activity*. Z. Naturforsch. 38c: 916-922.
- SCOTT, A. I.; H. MIZUKAMI y S. LEE (1979). *Characterization of 5-methyltryptophan resistant strain of Catharanthus roseus cultured cells*. Phytochemistry 18: 795-798.