

## Establecimiento de Cultivos *In Vitro* de *Galipea longiflora*, una Rutaceae de la Amazonia Boliviana

Magalí PAZ <sup>1\*</sup>, Felipe VÁZQUEZ <sup>2</sup>, Rogelio CHUQUI <sup>3</sup>, Crispín PAREDES <sup>1</sup>, Michel SAUVAIN <sup>4</sup> & Alberto GIMÉNEZ <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas. La Paz, Bolivia.

<sup>2</sup> Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México.

<sup>3</sup> Comunidad de Santa Rosa de Maravilla, Prov. Abel Iturralde, La Paz, Bolivia.

<sup>4</sup> Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia.

**RESUMEN.** *Galipea longiflora* (Rutaceae) es una especie productora de alcaloides del tipo quinolínicos, los cuales presentan una actividad antiparasitaria importante frente a cepas de *Leishmania*. Empleando técnicas de cultivo *in vitro* se ha logrado un cultivo en batch de esta especie amazónica. Se evaluaron diferentes tipos y concentraciones de fitoreguladores vegetales. La combinación 2,4-D (5 mg/L) y cinetina (0.1 mg/L) demostró ser muy eficiente para la inducción y producción de callos friables a partir de hojas. Los callos se emplearon como fuente de inóculo para establecer cultivos en suspensión celular, en medio líquido salino Murashige & Skoog y vitaminas del medio Gamborg's B5 a 100 r.p.m. y 25 °C en condiciones de oscuridad completa. En las suspensiones celulares se evaluaron la biomasa (peso fresco, peso seco) y la presencia de metabolitos secundarios (alcaloides), con la finalidad de caracterizar este cultivo en suspensión.

**SUMMARY.** "Establishment of *In Vitro* Cultures of *Galipea Longiflora*, a Rutaceae From Bolivian Amazonia". *Galipea longiflora* (Rutaceae) is a plant able to produce alkaloids of the quinoline type, which display strong antiparasitic activity against *Leishmania* strains. Using techniques for *in vitro* plant cell cultures, a batch culture from this amazonian tree was generated. Different types and concentrations of plant hormones were studied. The combination of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (5 mg/L) and Kinetine (0.1 mg/L), was very efficient for the induction and production of friable callus from leaves. The callus were used as source of inoculums, for establish cultures in cellular suspension in Murashige & Skoog salt liquid medium and vitamins from the Gamborg's B5 medium, maintained at 25 °C on an orbital shaker at 100 rpm, in complete darkness conditions. In the cellular suspension were evaluated the biomass (fresh and dry weight) and the presence of secondary metabolites (alkaloids) in the medium, in order to characterize this suspension culture.

### INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en numerosos países de Latinoamérica, Asia y África; se estima que aproximadamente, 20 millones de personas están infectadas, 350 millones en riesgo de adquirir la infección y se presentan alrededor de 400 000 nuevos casos por año <sup>1</sup>. En el ámbito de Latinoamérica, Bolivia se ha destacado principalmente por presentar los más altos índices de leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis cutánea <sup>2</sup>, siendo un importante problema de salud pública. Actualmente se disponen de pocos medicamentos adecuados para el tratamiento de esta enfermedad y su acceso es restringido a la población afectada,

por lo que se están buscando alternativas terapéuticas a los tratamientos convencionales, razón por la cual se ha incrementado la demanda de especies vegetales que en un momento dado puede dar lugar su extinción. El cultivo de células vegetales ha sido planteado como una alternativa para producir los compuestos de interés en forma continua y por largos periodos de tiempo, previniendo una explotación irracional de los recursos naturales <sup>3</sup>.

*Galipea longiflora* es una rutácea, utilizada en la medicina tradicional boliviana por diversos grupos étnicos asentados en la amazonía <sup>4</sup>. Esta especie, conocida como "evanta", es productora de alcaloides, cuyas propiedades leishmanicidas

**KEY WORDS:** *In vitro* culture, *Galipea longiflora*, Quinoline alkaloids.

**PALABRAS CLAVE:** Alcaloides quinolínicos, Cultivo *in vitro*, *Galipea longiflora*.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: Magali-PazGarcia@biociencias.org

están bien documentadas. Los extractos crudos de raíz, corteza y hojas, demuestran actividad con IC<sub>90</sub> entre 25 a 100 µg/mL, frente a *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani*<sup>5</sup>. El género *Galipea* comprende más de veinte especies, varias de las cuales están localizadas en América del Sur<sup>6</sup>. Entre dichas especies, *G. longiflora* es la mayor productora de alcaloides quinolínicos leishmanicidas. La purificación de extractos crudos obtenidos de la corteza, hojas y raíces de esta planta permitió identificar varios compuestos activos. Entre éstos, los más activos frente a las cepas de *Leishmania* son la 2-propil y 2-pentil isoquinolina. Pruebas *in vivo* e *in vitro* de estos compuestos, han demostrado su propiedad leishmanicida<sup>7-10</sup>. Al mismo tiempo se ha reportado la actividad biológica de los mismos frente a cepas de *Plasmodium vinckei petteri*<sup>11</sup>. Dadas las interesantes características del género *Galipea*, se ha seleccionado a la especie *G. longiflora* para establecer un cultivo en suspensión celular, a partir de callos obtenidos de hojas de plántulas de esta especie. En el presente trabajo se reportan el establecimiento de cultivo *in vitro* de *G. longiflora* y las características de crecimiento tanto del cultivo de callos, como de las suspensiones celulares y la producción de alcaloides quinolínicos. Este es el primer reporte de cultivos *in vitro* de esta especie.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material vegetal

Plantas jóvenes de *Galipea longiflora* fueron colectadas en la comunidad de Santa Rosa de maravillas, localizada en la provincia Abel Iturralde, zona de San Buenaventura del Departamento de La Paz, Bolivia. Ejemplares del material biológico colectado fueron identificados y

depositados en el Herbario Nacional de Bolivia (voucher AS49 Caicahuara y SD17 Santa Rosa de Maravillas). Estas plantas fueron mantenidas en invernaderos a 28 °C y empleadas como fuente de explantes para la inducción de callos.

### Cultivo de callos

Para el inicio de cultivo de callos se tomaron hojas de plántulas de *G. longiflora* las mismas fueron esterilizadas superficialmente en etanol al 70% (v/v), cloruro de piridonio 0.15% (v/v) por 30 seg, hipoclorito de sodio 2% (v/v) durante 30 min, Benlate® 0,1% (p/v) por 5 min y anfotericina B 15 mg/L durante 10 min. Después de tres enjuagues en agua destilada estéril, las hojas fueron seccionadas en piezas de 5 mm por lado y transferidas a cajas de Petri conteniendo la formulación salina inorgánica M&S<sup>12</sup> (Sigma) y vitaminas del medio Gamborg's B5<sup>13</sup> (Sigma) suplementado con 100 mg/L de mioinositol y sacarosa 3% (p/v). A este medio se adicionaron las combinaciones hormonales descritas en la Tabla 1. El pH del medio fue ajustado a 5,8 y se adicionó agar 0.8% (p/v) (Sigma), la esterilización del medio se la realizó en autoclave (All American 25X) por 15 min a una temperatura de 120 °C. Las cajas se incubaron a 25 °C en una cámara de cultivo, en condiciones de oscuridad completa y de luz con un fotoperiodo de 16 h e intensidad de 50 µmols<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>. Los callos fueron subcultivados cada 3 semanas. Las porciones friables de los callos fueron subcultivados durante ocho ciclos de tres semanas antes de inducir las suspensiones celulares.

### Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares, se iniciaron mediante la transferencia de 1gramo de tejido de

Ensayos	Tratamiento A 2,4-D/BAP	Tratamiento B 2,4-D/Kin	Tratamiento C NAA/BAP	Tratamiento D NAA/KIN
M1	0/10	0/10	0/10	0/10
M2	0.1/5	0.1/5	0.1/5	0.1/5
M3	0.5/5	0.5/5	0.5/5	0.5/5
M4	1/1	1/1	1/1	1/1
M5	5/5	5/5	5/5	5/5
M6	5/0.1	5/0.1	5/0.1	5/0.1
M7	10/0	10/0	10/0	10/0
M8	0	0	0	0

**Tabla 1.** Combinaciones y concentraciones de fitorreguladores para el inicio y mantenimiento del cultivo de callos a partir de explantes de *Galipea longiflora*. De A a D relación de auxina/citocina, de M1 a M7 concentraciones en mg/L de las fitohormonas utilizadas, M8 control sin fitorreguladores.

callo en matraces erlenmeyer de 125 mL de capacidad, conteniendo 50 mL de medio líquido salino (M&S) y las vitaminas del medio Gamborg's B5, con la combinación hormonal que favoreció la generación de callos en condiciones de oscuridad completa (5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0.1 mg/L de cinetina). Los cultivos celulares fueron incubados en una cámara de cultivo a 25 °C sobre un agitador orbital rotatorio (Heidolph Unimax 2010) a una velocidad de 100 r.p.m. en oscuridad completa, por un periodo de 30 días, colectándose la biomasa y el medio líquido en intervalos de 5 días.

#### **Determinación de peso fresco y peso seco**

La biomasa generada a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días de cultivo, fue separada del medio líquido mediante filtración al vacío, lavada varias veces con agua destilada y el exceso de agua se eliminó con papel absorbente. El peso fresco se determinó en una balanza de precisión e inmediatamente el tejido fue congelado y sometido a un proceso de liofilización en un equipo Finn Aqua Lyovac GT2 durante 72 h y se registró el peso seco del material vegetal. Estas determinaciones se realizaron por triplicado. Con los datos obtenidos se determinó el índice de crecimiento, considerando las recomendaciones de Nezvedoca *et al.*<sup>14</sup>.

#### **Extracción de alcaloides totales**

Para extraer los alcaloides presentes en el medio residual, se procedió a realizar tres lavados de la muestra (50 mL) con diclorometano (50 mL X3). La fase orgánica obtenida se concentró por evaporación a presión reducida (Büchi 4461) a una temperatura de 40 °C y fue sometida a presión reducida (Vaccubrand D6980). Las muestras así obtenidas, fueron comparadas con patrones de referencia, mediante cromatografía en capa delgada

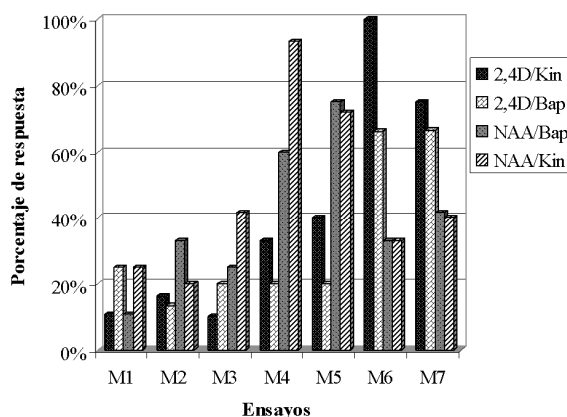
#### **Determinación y análisis de alcaloides por medio de cromatografía en capa delgada**

El análisis se llevó a cabo en placas de gel de sílice 60254 (Alugram). Utilizando una mezcla de éter de petróleo: acetato de etilo 75:25 como fase móvil. Los alcaloides fueron detectados al observar las placas bajo luz ultravioleta de onda corta y de onda larga (254 nm y 365 nm). El revelador empleado para evidenciar la presencia de alcaloides fue el reactivo de Dragendorff.

## **RESULTADOS**

### **Cultivo de callos**

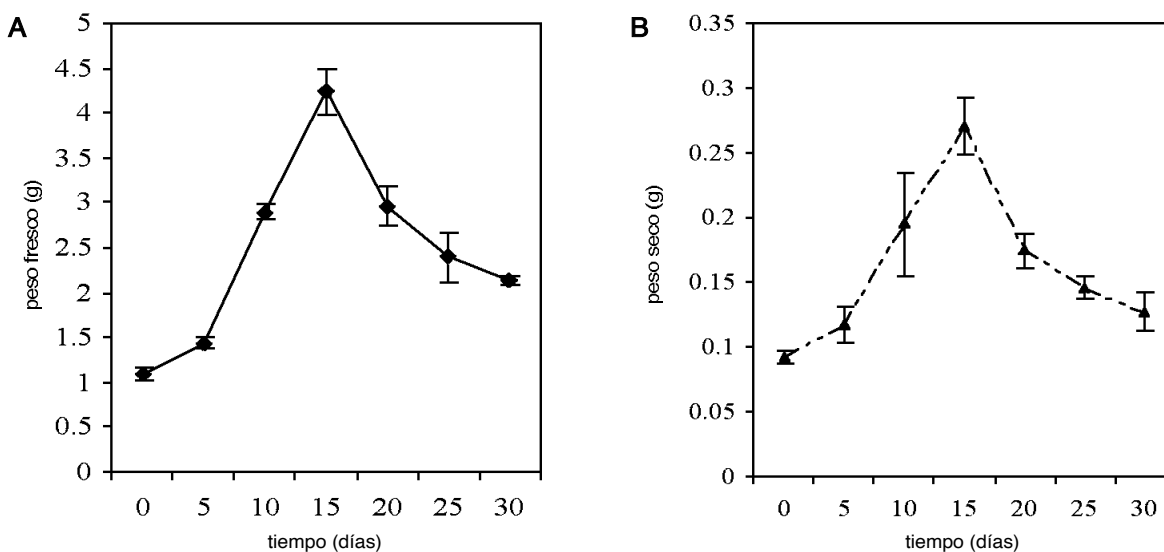
Un cociente alto de auxinas en relación con la concentración de citocininas favoreció la formación de callos. Los tejidos expuestos a la combinación con 5 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de cinetina, dieron lugar a la formación de callos friables a los 20 días de iniciado su cultivo (Fig. 1). En los demás tratamientos, si bien se observó la formación de callos, los mismos presentaron una consistencia poco friable. Por otra parte se ha determinado que la exposición de los callos a la luz condiciona un proceso de vitrificación evidente del material vegetal, en oscuridad completa este proceso no fue observado.



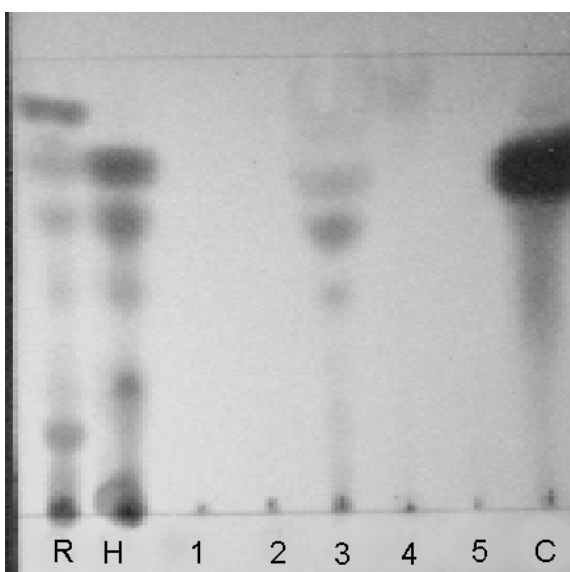
**Figura 1.** Porcentaje de formación de callos a partir de explantes de hojas de *Galipea longiflora* en función a la concentración de auxinas y citocininas. El porcentaje de respuesta se refiere al número de eventos de formación de callo a partir de un total de 18 explantes después de 30 días de cultivo. Los datos representan el promedio de tres repeticiones.

### **Evaluación de los parámetros de crecimiento en suspensión celular**

Se realizó una curva de crecimiento de los cultivos en suspensión celular, considerando las determinaciones de peso fresco y peso seco, observándose un comportamiento similar para ambas determinaciones (Fig. 2). En esta curva se observa una fase de crecimiento lento que abarca los primeros 5 días del ciclo de cultivo, que corresponde a una fase de latencia, seguida por una fase de crecimiento exponencial que se extiende hasta los 15 días, posteriormente la



**Figura 2.** Curvas de crecimiento de cultivos en suspensión celular de *Galipea longiflora* durante 30 días de cultivo a 100 r.p.m. y 25 °C en condiciones de oscuridad completa. **A:** variaciones en peso fresco. **B:** variaciones en peso seco. Los datos representan el promedio de tres repeticiones con el error standard asociado.



**Figura 3.** Perfiles cromatográficos TLC para la identificación de alcaloides totales presentes en medio líquido de suspensiones celulares. **R:** raíces planta de invernadero; **H:** hojas planta de invernadero; **1 y 2:** medio líquido M&S (blanco); **3:** medio líquido filtrado exento de biomasa (callos 15 días de cultivo); **4 y 5:** medio líquido filtrado exento de biomasa (callos 30 días de cultivo); **C:** 2 fenil-quinolina aislado de la corteza de *Galipea longiflora*.

biomasa descendió de manera notable. El índice de crecimiento para este sistema fue de 3,14 a los 15 días de cultivo, aunque después de 30 días de cultivo disminuyó a 1,05, lo que sugiere que el cultivo debe ser transferido a medios frescos en un periodo máximo de dos semanas.

La velocidad de crecimiento, corresponde a la pendiente de la fase exponencial del cultivo y se determinó como el equivalente a 0,0153 g/día.

#### **Análisis cualitativo de alcaloides totales**

En el análisis por TLC, los cromatogramas muestran claramente la coincidencia en composición entre los extractos de los cultivos y los extractos obtenidos de los tejidos de la planta adulta y las plantas en invernadero; más importante aún, varios de los componentes de tipo alcaloide se observaron en el medio líquido procedente de las suspensiones celulares (Fig. 3).

#### **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

A partir del material vegetal colectado se obtuvieron alcaloides quinolínicos utilizados como productos de referencia para el análisis cromatográfico. La identificación de 2-fenil quinolina, alcaloide mayoritario de *G. longiflora* fue posible mediante la interpretación de sus datos de espectroscopía. Los resultados obtenidos en lo referido a la química de esta especie coincidieron con lo reportado previamente por otros autores <sup>8,9</sup>. Para la introducción de esta especie a condiciones de cultivo *in vitro*, la determinación de las condiciones óptimas de desinfección del material vegetal colectado, se vio dificultada por las elevadas tasas de contaminación, lo escaso del material vegetal (plántulas jóvenes) y la elevada recalcitrancia de la especie. La principal contaminación observada en el material vegetal

fue la fúngica, por esto se empleó anfotericina B, que dio lugar a una reducción drástica de los niveles de contaminación. Para el establecimiento de los cultivos *in vitro* de *G. longiflora* a partir de callos se determinó que la combinación hormonal denominada M6A (5 mg/L de 2,4 D y 0,1 mg/L de cinetina) es la óptima para su desarrollo. A partir de los callos generados en estas condiciones se han iniciado el cultivo semicontinuo de células vegetales y se ha caracterizado su patrón de crecimiento. En el cultivo celular *Galipea longiflora* se ha determinado un comportamiento similar a cultivos de *Taxus baccata*<sup>15</sup>, en los cuales se observa una disminución del crecimiento después de alcanzar su valor máximo, ya sea por una reducción del volumen celular, la muerte de las células al ir agotándose los nutrientes del medio o por la formación de productos tóxicos. Disponer de un sistema

de cultivo en suspensión celular de esta planta es relevante para futuros trabajos, dirigidos a incrementar el contenido de alcaloides, dado que permitiría la aplicación de condiciones de inducción tanto biótica como abiótica que puedan promover la acumulación de estos alcaloides. Este sistema permitirá también realizar estudios sobre las enzimas involucradas en la síntesis de los alcaloides de interés, con el fin de identificar los puntos de regulación más importantes.

**Agradecimientos.** Al IRD Francia, por el financiamiento del proyecto "Jeune Equipe" (BIOLEISH) que ha permitido el desarrollo de este trabajo, a SIDA/SAREC Suecia, por la actualización de un equipo HPLC Waters y a la fundación Alexander von Humboldt-Stiftung de Alemania, por donaciones de equipos. Al CIPTA (Consejo Indígena de los Pueblos Tacana) y a la comunidad de Santa Rosa de Maravillas.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (2004) Leishmaniasis. Disponible en <http://www.who.int/health-topics/leishmaniasis.htm>. Revisada el 9 de marzo de 2005
2. Davies C., R. Reithinger, D. Campbell-Lendrum, D. Feliciangeli, R. Borges & N. Rodriguez (2000) *Cad. Saude Publica* **16**: 925-50.
3. Mulabagal, V. & H. Tsay (2004) *Int. J. Appl. Sci. Eng.* **2**: 29-48.
4. Bourdy, G., A. Giménez & C. Quenevo (1999) "Tacana: Ecuanaasha Aquí, Ecuanaasha Id'rene Cuana, Me Schanapaque: Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas", Plural ed., págs. 414-6.
5. Fournet, A., A. Angelo, V. Muñoz, R. Hocquemiller, A. Cavé, P. Richomme & J. Bruneton (1994) *Phytother. Res.* **8**: 174-8.
6. Killeen, T., E. García & S. Beck (1993) "Ruta - ceae", en Guía de árboles de Bolivia. (Instituto de Ecología ed.) La Paz, Bolivia, págs. 705-6.
7. Fournet, A., A. Angelo, V. Muñoz, R. Hocquemiller, A. Cavé & A. J. Bruneton (1993) *Drugs Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 859-63.
8. Fournet, A., B. Vagneur, P. Richomme & J. Bruneton (1989) *Can. J. Chem.* **67**: 2116-8.
9. Fournet, A., R. Hocquemiller, F. Roblot, A. Cavé, P. Richomme & J. Bruneton (1993) *J. Nat. Prod.* **56**: 1547- 52.
10. Fournet A., J. Gantier, A. Gautheret, L. Leysalles, M. Muñoz & J. Mayrargue (1994) *J. Anti - microb. Chemother.* **33**: 537-44.
11. Gantier, J.C. (1996) *Planta Medica* **62**: 285-6.
12. Murashige T. & F. Skoog (1962) *Physiol. Plant.* **15**: 473-97.
13. Gamborg O., R. Miller & K. Ojima (1968) *Exp. Cell Res.* **50**: 151-8.
14. Nezvedoka L., M. Hesse, J. Dusec & C. Werner (1999) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **58**: 133-40.
15. Laskaris G., M. Bounkhay, G. Theodoridis, R. van der Heijden, R. Verpoorte & M. Jaziri (1999) *Plant Sci.* **147**: 1-8.