

Efecto del estrés oxidativo en la expresión de proteínas solubles en cultivo de raíces de
*Uncaria tomentosa*Ileana Vera-Reyes⁽¹⁾, Ariana A. Huerta-Heredia⁽¹⁾, M^a Teresa Ponce-Noyola⁽¹⁾, Ana C. Ramos-Valdivia⁽¹⁾¹CINVESTAV-IPN, Depto. Biotecnología y Bioingeniería. Av. Politécnico Nacional 2508 México, DF. C.P. 07360.

E-mail: aramos@cinvestav.mx

Palabras clave: Proteómica, alcaloides, estrés oxidativo, *Uncaria tomentosa*

Introducción. *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae); planta originaria de la región amazónica del Perú, comúnmente llamada uña de gato produce alcaloides oxindólicos monoterpénicos (AOM) tal como la pteropodina, mitrafilina y sus isómeros. Estos AOM tienen actividad farmacológica inmunestimulante, antitumoral, antileucémica y anti-inflamatoria (1). En cultivos raíces de *U. tomentosa* se ha demostrado que la producción alcaloides indol-monoterpénicos puede ser inducida por efecto del estrés oxidativo (2). El estrés oxidativo en plantas es caracterizada por una rápida producción de especies reactivas de oxígeno p.e. H₂O₂, como una molécula intermediaria en la respuesta del estrés biótico y abiótico (3). Esto resulta en una cascada de señales que permiten la activación transcripcional de numerosos genes de defensa y consecuentemente la biosíntesis de una gran variedad de metabolitos secundarios. Como un acercamiento inicial para identificar las enzimas involucradas en la biosíntesis de AOM, se evaluó la respuesta diferencial en el perfil proteómico en cultivos de raíces de *U. tomentosa* sometido a la adición de agentes oxidantes (H₂O₂ y BSO) y su relación con la producción de alcaloides.

Metodología. Los cultivos de raíces de *U. tomentosa* (Utr-3) y análisis de alcaloides fueron realizados de acuerdo a Huerta-Heredia (2). Los cultivos fueron elicitados con 200 μM H₂O₂ ó 0.2 mM ácido jasmónico (JA) más 0.8 mM butionina sulfoximina (BSO) a los 13 días de crecimiento. La concentración de alcaloides y proteína fueron analizados 8 días después de la elicitación. Para el análisis en los geles-2D se tomaron 5 g. La extracción de proteína se realizó con acetona, TCA (10 %) y β-mercaptoetanol (0.07%). El precipitado fue solubilizado en buffer de rehidratación y se cargaron 50 μg de proteína en tiras de 11 cm, con un gradiente de pH entre 4-7 (IPG, BioRad). El isoelectroenfoco se llevo a cabo a 20 °C a 70 kVh (PROTEAN IEF Cell). El SDS-PAGE se realizó en geles con gradiente de 4-15% (BioRad).

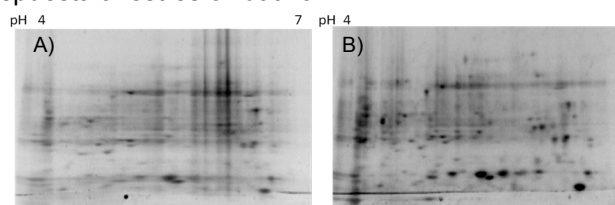
Resultados y discusión. Los cultivos de raíces en matraz acumulan dihidrocadambina (DHC, un glucoalcaloide) y AOM. La adición de H₂O₂ mostró un incremento en la producción de AOM de 1.8 veces comparado con el cultivo control, por otro lado se observó una acumulación de 3.5 veces DHC. De manera similar a la adición de peróxido, el BSO/JA incrementó 1.9 veces la producción de AOM y 2.75 veces la acumulación de DHC (Cuadro 1). El incremento en la producción de alcaloides indólicos en las raíces bajo

estrés oxidativo correlacionó con un incremento en la concentración de proteínas (1.3 veces) que nos abre la oportunidad de conocer aquellas proteínas involucradas en su biosíntesis.

Cuadro 1. Efecto de la adición de H₂O₂ y BSO/JA en la producción de alcaloides indólicos

Tratamiento	AOM μg/gPS	DHC μg/gPS
Control	370.78±15.3	328.43± 74.5
H ₂ O ₂	658.2±76.1	1135.9±154.2
BSO/JA	696.15±37.05	903.34±209.7

El análisis proteómico de los cultivos elicitados mostró alrededor de 120 proteínas de las cuales, 20 manchas proteicas no fueron observadas en el control (Fig 1). Esto sugiere una mayor expresión de las enzimas en respuesta al estrés oxidativo.

Fig. 1. Geles en 2D de proteína de raíces *Uncaria tomentosa* A) Control; B) Acido jasmónico (0.2 mM) / BSO (0.8mM)

El cambio más evidente se encuentra en la zona de un pI de 5.1- 6 y una masa de 50 kDa aproximadamente. En *C. roseus* se ha identificado que en esta área, se encuentran las proteínas involucradas en la biosíntesis de alcaloides indólicos (4).

Conclusiones. En respuesta al estrés oxidativo las raíces de *U. tomentosa* incrementan la producción de alcaloides y la expresión de un mayor número de proteínas.

Agradecimientos. Al CONACyT por la beca otorgada No 173034.

Bibliografía.

1. Heitzman, M.E., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B. (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochem*, 66:5-29.
2. Huerta-Heredia A., Trejo-Tapia G., Cerda-García-Rojas C.M., Ramos-Valdivia A.C.(2008). Increased alkaloid production in root cultures of *Uncaria tomentosa* by oxidative stress. PE Young dietist's meeting in future trends in phytochemistry Compounds –Enzymes – Genes. Bad Herrenalb, Alemania.
3. Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399.
4. Jacobs D.I., Gaspari M., Van der Greef J., Van der Heijden R and Verpoorte R. (2005) Proteome analysis of the medicinal plant *Catharanthus roseus*. *Planta*, 221: 690–704.