



PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES ACTIVAS DE OXIGENO EN LA PRODUCCION DE ALCALOIDES OXINDOLICOS POR SUSPENSIONES DE *Uncaria tomentosa* EN BIORREACTOR

Gabriela Trejo^{1,2}, Gabriela Sepúlveda², José Luis Trejo², Carlos Cerda³, Ana Ramos¹ y Mario Rodríguez²
¹Depto. Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. ²Depto. Biotecnología. CEPROBI-IPN. ³Depto. Química. CINVESTAV-IPN. ¹Av. Instituto Politécnico Nacional 2508. San Pedro Zacatenco. México, D. F. 07360.
Fax: (55) 50613313. gttapia @ipn.mx.

Palabras clave: alcaloides oxindólicos, estallamiento oxidativo, *Uncaria tomentosa*.

Introducción. *Uncaria tomentosa* (*Ut*) acumula alcaloides oxindólicos monoterpénicos (AOM), alcaloides de alto grado de oxidación, con actividad farmacológica (1). En un estudio previo se observó que la producción de AOM en tanque agitado (TA) es 10 veces mayor que en matraces (MT) (2). En la célula vegetal uno de los eventos bioquímicos que se presenta ante condiciones de estrés es el incremento en las especies activas de oxígeno (EAO), que a su vez puede estar relacionado con la biosíntesis de metabolitos secundarios. Con base en lo anterior, el objetivo del trabajo fue estudiar la participación de las EAO en la producción de AOM por suspensiones celulares de *Ut* cultivadas en TA.

Metodología. Se cultivaron suspensiones de *Ut* en TA de 2 l operado a 400 rpm (2) y como referencia se cultivó *Ut* en MT. En ambos casos, las EAO (H_2O_2 extracelular) se evaluaron por luminiscencia y los AOM por rHPLC durante la cinética de crecimiento. Para determinar si el O_2 y/o la agitación inducen un aumento en EAO, *Ut* fue expuesta a incremento en la tensión de oxígeno disuelto (TOD) y al aumento en la agitación (con y sin control de TOD) al 6° día de cultivo (etapa en que no se presentan EAO ni AOM).

Resultados y discusión. En las células de *Ut* cultivadas en TA aumentaron las EAO con máximo a 0.5 h. En MT el perfil de EAO fue similar al del TA pero 3 órdenes de magnitud menor (Fig. 1A). En TA el aumento en EAO precedió al de AOM, cuyo máximo ocurrió a las 24 h (178 μ g/l), mientras que en MT no hubo AOM (Fig. 1B).

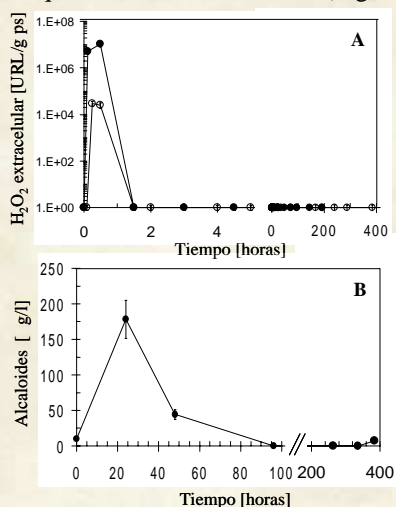


Fig. 1. H_2O_2 extracelular (A) y AOM (B) en suspensiones de *U. tomentosa* en TA (símbolo lleno) y MT (símbolo vacío).

El incremento en TOD (25 a 85%) y/o en la agitación (400 a 700 rpm) por 90 min en el día 6 de cultivo, indujeron un aumento en EAO similar al observado en el TA al inicio del mismo (Fig. 1A), lo que también estuvo relacionado con la acumulación de AOM 24 h después de aplicar el estímulo (datos no mostrados). Esto indica que ambos factores de estrés propios del TA pueden ser utilizados para inducir un aumento en EAO en *Ut* y favorecer la acumulación de AOM. Con el fin de conocer si en el TA la producción de EAO es debida a la actividad de la NAD(P)H oxidasa de membrana plasmática y/o a peroxidasas de pared celular, se probaron inhibidores de estas enzimas (cuadro 1). Se observó que la inhibición en H_2O_2 coincidió con la disminución en AOM. Por otro lado, en MT se indujo la producción de H_2O_2 mediante el sistema glucosa/glucosa oxidasa y se observó la producción de AOM de forma similar que en TA (datos no mostrados).

Cuadro 1 Inhibidores de EAO en la producción de H_2O_2 y AOM

Inhibidor (dosis)	Blanco	Producción relativa (%)	
		$H_2O_2^a$	AOM ^b
Control sin inhibidor		100	100
+ DPI (1 μ M)	NAD(P)H oxidasa	8	5
+ NaN_3 (10 μ M)	Peroxidasas	18	8
+ SHAM (100 μ M)	Peroxidasas	85	0

^a 100% = H_2O_2 a 0.5 h (100% = 1.02×10^7 URL/g peso seco).

^b 100% = AOM a las 24 h (100% = 178.3 μ g/L).

Los resultados anteriores muestran que el estrés en TA (O_2 y agitación) induce en *Ut* la producción de EAO que son determinantes para la acumulación de AOM. La síntesis de EAO es atribuible a la NAD(P)H oxidasa de membrana y a peroxidasas de pared. Estos resultados son consistentes con la oxidación de intermediarios indólicos a oxindoles por acción de peroxidasa de rábano y H_2O_2 (3).

Conclusiones. El estrés (oxígeno y/o agitación) en un TA induce la acumulación de EAO en las suspensiones celulares de *Ut* y es requerido para estimular la biosíntesis de AOM.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por CONACyT (proyectos 43228 y 43861) y CGPI-IPN (20050035 y 20050058).

Bibliografía.

1. Laus, G. (2004). Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. *Phytoter. Res.* 18:259-274.
2. Trejo-Tapia, G, Cerda-García-Rojas, C. M., Rodríguez-Monroy, M, Ramos-Valdivia, A. C. (2005). Monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. cell suspension cultures in a stirred tank bioreactor. *Biotechnol. Prog.* DOI:10.1021/bp049608s.
3. Folkes, L. K, Greco, O, Dachs, G. U. (2002). 5-fluoroindole-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potential for use in targeted cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* 63:265-272.