

ACTIVIDAD DE LA TRIPTOFANO DESCARBOXILASA EN CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Uncaria tomentosa* Willd (D.C.)

Victor Hugo Chávez Tovar, Jaime Ortega López, Roberto Ruiz Medrano, Ana C. Ramos Valdivia
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Apartado postal 14-740, CP 07000.
México, D.F. Fax: (5) 7477000 ext. 4305, e-mail: aramos@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: *Triptofano descarboxilasa, Uncaria, Células en suspensión*

Introducción. *Uncaria tomentosa* conocida comúnmente como “uña de gato” es una Rubiaceae que ha sido utilizada en medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos. Estas propiedades farmacológicas le son conferidas por los metabolitos secundarios que produce, entre los que se encuentran alcaloides indol y oxindol terpénicos. Los alcaloides indólicos son biosintetizados por la condensación de dos rutas metabólicas provenientes del Shikimato y del GAP/Piruvato (1). En la ruta del Shikimato se encuentra la Triptofano Descarboxilasa (E.C. 4.1.1.28) que descarboxila al L-Triptofano y en algunas especies al 5-Hidroxi-L-Triptofano para originar al protoalcaloide triptamina, que es uno de los precursores de los alcaloides indólicos y del ácido indol acético. Se ha propuesto que esta enzima une al metabolismo primario con el secundario de la planta y participa en la formación de pozas de triptamina disponible para la biosíntesis de alcaloides indólicos (1).

En este trabajo hemos determinado la especificidad de la Triptofano Descarboxilasa (TDC) para diferentes sustratos, así como su actividad en un medio de mantenimiento y de producción de alcaloides durante el ciclo de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa*.

Metodología. Se utilizó una línea celular proveniente de hoja, la cual fue cultivada en medio de mantenimiento (MM) MS-62 con 2,4-D y cinetina y en medio de producción de alcaloides (MP) MS-62 con IAA y cinetina (2) e incubadas en condiciones de oscuridad. En la obtención del extracto crudo se utilizó buffer de extracción (fosfatos 0.1M pH 7.5 con 1 mM de EDTA y 1 mM de PMSF). Para la especificidad del sustrato la enzima se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% y se utilizó como sustratos al L-Triptofano, 5-Hidroxi-L-Triptofano y 5-Hidroxi-DL-Triptofano a una concentración de 5 mM. En el ensayo de actividad se utilizó buffer de fosfatos 0.1M pH 7.5 con P-5-P, L-Triptofano y $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ más extracto enzimático. La medición de la actividad enzimática se realizó por espectrofluorometría a una excitación de 270 nm y una emisión de 340 nm con un slit de 2.5. La determinación de proteína se realizó de acuerdo a Peterson.

Resultados y Discusión. La TDC tuvo especificidad hacia el L-Triptofano, no así para el 5-Hidroxi-L-Triptofano ni para el 5-Hidroxi-DL-Triptofano (Fig. 1). Estos resultados difieren a los reportados para TDC de *Cinchona ledgeriana* y *Catharanthus roseus*, donde la TDC si acepta como sustratos al 5-Hidroxi-L-Triptofano y al 5-Hidroxi-DL-Triptofano con menor afinidad que al L-Triptofano (3). La actividad de la TDC obtenida durante el ciclo de crecimiento del cultivo fue semejante en ambos medios de cultivo MM y MP, observándose un ligero incremento en la actividad de la TDC al sexto día de cultivo (fig. 2), sin embargo no se indujo la TDC en el medio de producción. Al mismo tiempo se observó que la actividad de la TDC fue constitutiva, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en órganos vegetales (4) y en algunas líneas celulares de *Catharanthus roseus* (5) y

Cinchona ledgeriana (3). La concentración de triptamina en las células también permaneció constante durante el ciclo de crecimiento del cultivo (datos no mostrados). La no inducción de la TDC en el MP, posiblemente se deba a la existencia de pozas de triptamina en las células.

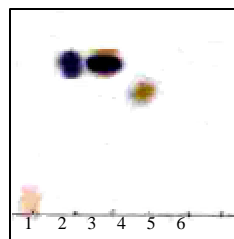


Fig. 1. Especificidad de la TDC para diferentes sustratos. 1=Estándar de L-triptofano (rf 0.01), 2=Estándar de Triptamina (rf 0.91), 3=Incubación con L-Triptofano, 4=Estándar de 5-Hidroxi-triptamina (rf 0.65), 5=Incubación con 5-Hidroxi-L-triptofano (ND) y 6=Incubación con 5-Hidroxi-DL-triptofano (ND).

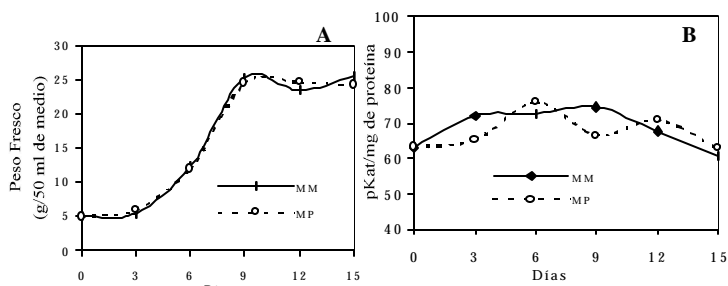


Fig. 2. A. Crecimiento B. Actividad de la TDC en cultivo células en suspensión de *Uncaria tomentosa*.

Conclusiones. La TDC muestra una especificidad de sustrato por el L-Triptofano. La TDC no se indujo en el medio de producción de alcaloides. La cantidad de triptamina en las células permaneció constante.

Agradecimientos. Proyecto CONACyT No. 31429-B

Bibliografía.

1. Verpoorte, R, Van Der Heijden, R, Memelink, J. 1998. *The alkaloids*. Academic Press. Leiden, The Netherlands. 469-471
2. Luna-Palencia, G, Trujillo, N, Velazquez, T, Cerda-García-Rojas, CM, Ramos-Valdivia, A. 2001. 5th European Symposium on Plant Isoprenoids. Bonn, Germany.
3. Stevens, LH, Schripsema, J, Pennings, EJM, Verpoorte, R. 1992. *Plant Physiol. Biochem.* 30:675-681.
4. De Luca, V, Alvarez Fernández, J, Campbell, D, Kurz WGW. 1988. *Plant Physiol.* 86:447-450
5. Merillon, JM, Doireau, P, Guillot, A, Chénieux, JC, Rideau, M. 1986. *Plant Cell Report.* 5:23-26.