

## **EVENTOS ANTIOXIDANTES ASOCIADOS A LA ELICITACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Thevetia peruviana* PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS CARDIOTÓNICOS**

---

**Carlos Julio Nova López**

Laboratorio de Bioconversiones, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Medellín, Colombia.  
Ingeniero biológico. Estudiante de Maestría en Ciencias – Biotecnología  
[cjnoval@unal.edu.co](mailto:cjnoval@unal.edu.co)

## RESUMEN

*Thevetia peruviana* es una planta con capacidad de síntesis de glicósidos con actividad cardiotónica. El cultivo en suspensión de estas células vegetales es una alternativa para la producción, bajo condiciones controladas y reproducibles a escala industrial, de estos compuestos. En estos cultivos se ha reportado previamente la obtención de peruvósido, un glicósido cardiotónico que resulta de especial interés porque genera menos reacciones alérgicas en los pacientes, en comparación con otras moléculas de la misma naturaleza. En este trabajo, se estudiaron los eventos antioxidantes asociados a la elicitación de cultivos de células en suspensión con metil jasmonato (meJa) ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ). Se evaluó la producción de peruvósido, la viabilidad celular, la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la actividad de la enzima guayacol peroxidasa (G-POD) y la producción de especies reactivas de oxígeno totales (EROS). La adición de MeJa promovió la síntesis de peruvósido y estimuló la reducción en los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante la promoción de la actividad de la guayacol peroxidasa. Los resultados de este estudio contribuyen a comprender los eventos bioquímicos en el cultivo de células en suspensión bajo condiciones de elicitación, constituyéndose en un aporte para la producción in vitro de compuestos bioactivos.

**Palabras clave:** *T. peruviana*, glucósidos cardiotónicos, peruvósido, EROS.

## ABSTRACT

*Thevetia peruviana* is a plant capable of synthesizing glycosides with cardiotonic activity. The suspension culture of these plant cells is an alternative for the production, under controlled and reproducible conditions on an industrial scale, of these compounds. In these cultures has been reported the obtaining of peruvoside, a cardiac glycoside which is attractive because it generates less allergic reactions in patients, compared with other molecules of the same nature. In this work, the antioxidant events associated with the elicitation of cell cultures in suspension with methyl jasmonate (meJa) ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ) were studied. The peruvoside production, cell viability, production of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the activity of the enzyme guaiacol peroxidase (G-POD) and the production of total reactive oxygen species (EROS) were studied. The addition of MeJa promoted the synthesis of peruvoside and stimulated the reduction in  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels by promoting the activity of guaiacol peroxidase. The results of this study contribute to understand the biochemical events in the culture of cells in suspension under conditions of elicitation, constituting a contribution for the in vitro production of bioactive compounds.

**Keywords:** *T. peruviana*, cardiac glycosides, peruvoside, ROS

## INTRODUCCIÓN

Los cultivos de células vegetales en suspensión representan una alternativa para la obtención de metabolitos secundarios de interés industrial, frente a los métodos tradicionales de producción mediante síntesis química y extracción directa de las plantas. La posibilidad de producir estos metabolitos bajo condiciones

controladas y reproducibles y la posibilidad de desarrollar los procesos a escala industrial, hacen de ésta una técnica promisoría para la satisfacción de la creciente demanda de fármacos, cosméticos, biopesticidas, aditivos alimentarios y otros productos de alto valor agregado (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002).

Generalmente en los cultivos in vitro se obtienen los metabolitos en concentraciones muy bajas, por lo que es necesario implementar métodos que busquen aumentar los rendimientos de dichos productos. Estos métodos incluyen la optimización de los medios de cultivo, la selección de líneas celulares más productivas, las modificaciones genéticas y las intervenciones en las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de los metabolitos deseados (Dörnenburg y Knorr, 1995).

Una de las alternativas más efectivas para incrementar la producción de metabolitos secundarios en los cultivos de células vegetales es la elicitación (Tzer Miin Chong, Abdullah, Lai, Nor'Aini, & Lajis, 2005; Lu, Wong, & Teng, 2001; Suvarnalatha, Rajendran, Ravishankar, & Venkataraman, 1994). Mediante esta estrategia, el metabolismo de las células puede ser influenciado por factores externos, de tal forma que se genere un aumento de la biosíntesis del metabolito objetivo (Brodelius, 1996). Dependiendo de su origen, los elicitores pueden ser bióticos o abióticos, y entre ellos se pueden encontrar sustancias químicas y biológicas como el metil jasmonato (MeJa), el ácido salicílico (AS), metales, sales, extractos de hongos, bacterias o levaduras y factores físicos como luz, presión osmótica, temperatura y estrés hidrodinámico generado por la agitación del cultivo (Vasconsuelo y Boland, 2007).

El MeJa es una molécula que está ampliamente distribuida en las plantas y que actúa como modulador de varios procesos fisiológicos, que incluyen desde la fluorescencia y la senescencia, hasta la respuesta ante factores de estrés bióticos o abióticos, mediante la activación de la transcripción de genes que permiten a las células hacer frente a los patógenos o a otras condiciones deletéreas (Wolucka, Goossens y Inzé, 2005). Debido a que muchos metabolitos secundarios se sintetizan cuando aparecen

estas condiciones de estrés, el MeJa es usualmente utilizado como elicitor para favorecer, mediante la inducción de las cascadas de señalización, la síntesis de este tipo de metabolitos (Kang et al., 2006; Ram, Prasad, Singh, Hada y Kumar, 2013; Sivanandhan et al., 2013).

Uno de los eventos asociados a la elicitación con MeJa es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS). Especies como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el ion super óxido ( $O_2^-$ ) se producen en las células en condiciones normales como producto de la actividad metabólica, pero aumentan en respuesta a condiciones de estrés (Jabs, Dietrich y Dangl, 1996). Se ha reportado que estas moléculas participan como segundos mensajeros durante la inducción de genes de defensa (Pauw, van Duijn, Kijne, y Memelink, 2004). El peróxido de hidrógeno, por ejemplo, participa como mensajero luego de la elicitación con MeJa en células de tomate (Orozco, Narváez y Ryan, 2001); lo mismo ocurre con el ion superóxido en cultivos de raíces de *Panax ginseng*, cuya concentración aumenta con la adición del elicitor (Ali, Yu, Hahn y Paek, 2006).

A pesar de que, por lo general, el uso de elicitores estimula la producción de EROS, y a que estas especies son perjudiciales para las células por su alta reactividad, se ha encontrado que los elicitores también estimulan la maquinaria antioxidante. Enzimas como la super óxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX) y la guayacol peroxidasa (G-POD) aumentan su actividad en presencia de MeJa y otros elicitores (Aftab et al., 2011; Ali et al., 2006). En este sentido, el uso de elicitores como MeJa, tiene un efecto dual: por un lado, protege a las células frente a condiciones de estrés, activando la maquinaria antioxidante y la síntesis de metabolitos secundarios y, por otro, puede aumentar, en

algunos casos, la producción de EROS, con los subsecuentes daños que estas especies pueden producir a nivel de las membranas fosfolipídicas, el ADN y otras estructuras celulares.

*Thevetia peruviana* es una planta de la familia de las apocináceas que se caracteriza porque la gran mayoría de sus órganos secretan látex venenoso (Khare, 2007). Sus semillas, hojas y frutos se usan en la medicina tradicional como purgantes y para el tratamiento de la fiebre intermitente (Corrêa y Penna, 1985). Esta especie es importante en la industria farmacéutica debido a su capacidad de síntesis de glicósidos con demostrada actividad cardiotónica. Se han reportado dos familias de estos glicósidos conocidos como Thevetinas A y B, aisladas de las semillas, hojas y fruto del árbol, aunque la mayor concentración se ha encontrado en las semillas (Kohls, Scholz, Teske, Zark y Rullkötter, 2012; Villa, Hormaza y Arias, 2011). Recientemente, se ha reportado que los glicósidos cardiotónicos presentan también propiedades anticancerígenas (Haux, 1999; Smith, Madden, Vijjeswarapu y Newman, 2001; Stenkvis, 1999; Vaklavas, Chatzizisis y Tsimberidou, 2011).

Existen reportes del establecimiento de cultivos in vitro de *Thevetia peruviana* con fines de micropropagación (Kumar, 1992; Sharma y Kumar, 1994). En nuestro laboratorio se han establecido cultivos de células de esta especie con la intención de producir metabolitos de valor agregado a escala industrial. En este sentido, se reportó previamente la obtención de peruvósido en las suspensiones y los efectos de la elicitación con MeJa en su producción (Zabala, Angarita, Restrepo, Caicedo, & Perea, 2010). Este glicósido cardiotónico resulta de especial interés porque genera menos reacciones alérgicas en los pacientes, en comparación con otras moléculas de la misma naturaleza (Abe, Iwase, Yamauchi, Yahara y

Nohara, 1995).

Con el objetivo de dilucidar los fenómenos bioquímicos que conllevan al aumento de la síntesis de peruvósido y a la inhibición del crecimiento celular en cultivos de células en suspensión de *T. peruviana* tratados con MeJa, en este trabajo se evalúan los eventos antioxidantes asociados a la elicitación, a través de la medición de EROS y guayacol peroxidasa (G-POD).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para el establecimiento de los callos, se seleccionaron de manera aleatoria frutos verdes del árbol. Los frutos se lavaron con detergente comercial y agua destilada para remover las impurezas y eliminar el látex segregado. Posteriormente, se sumergieron en etanol 70% (v/v) por 5 minutos y en hipoclorito de sodio 10% (v/v) por el mismo periodo de tiempo.

### Establecimiento de callos y suspensiones celulares

Para la obtención de los explantes, se removió la capa superficial verde del fruto (exocarpio) y se tomaron muestras del mesocarpio de aproximadamente 1.5 mm de espesor. Los explantes se trasladaron de manera aséptica, en una cámara de flujo laminar, al medio de cultivo sólido para la inducción de los callos.

Se utilizó como medio de inducción, medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) suplementado con 30 g/l de sacarosa, 2 mg/l de 2,4-D y 2 mg/l de kinetina. El pH se ajustó a 5.8 antes de la esterilización de los medios en autoclave (121°C, 20 psi, 15 min). El mismo medio y composición hormonal se utilizó para los cultivos sólidos y las suspensiones. En el caso

de los cultivos sólidos se utilizó adicionalmente una concentración de 7 g/l de agar.

Los subcultivos se realizaron cada 14 días transfiriendo los explantes a medio de cultivo fresco. Después del cuarto subcultivo, las células que crecían sobre el explante fueron raspadas y cultivadas en medio nuevo.

Una vez obtenida suficiente masa de callos friables, estos fueron trasladados a 100 ml de medio líquido contenido en matraces de 250 ml, para el establecimiento de las suspensiones, que se mantuvieron agitadas y a temperatura ambiente a 110 rpm en un agitador orbital (Dimaq, diámetro de órbita 2.5 cm). Las suspensiones se tamizaron para eliminar los agregados provenientes de los callos y obtener suspensiones más finas.

### **Elicitación con MeJa**

Para el montaje experimental, se mezcló el contenido de dos suspensiones celulares con mínimo 4 subcultivos en un matraz que se aforó con medio líquido hasta 1 L. Para garantizar uniformidad del inóculo, se mantuvo en agitación, y se sirvieron 17 ml de la suspensión celular en matraces de 100 ml.

Para la elicitación con MeJa, se preparó una solución de  $17100 \text{ mg l}^{-1}$ , agregando  $0.21 \mu\text{l}$  de la sustancia pura (Sigma/Aldrich St. Louis, MO, USA) en 11.8 ml de etanol (99%), de tal forma que al agregar  $100 \mu\text{l}$  a cada suspensión, se obtuviera una concentración final de  $100 \text{ mg l}^{-1}$ . La solución de MeJa se esterilizó con filtros de  $0.2 \mu\text{m}$  y se agregó a los cultivos el día cero. Se tomaron muestras durante los primeros 5 días de cultivo. La biomasa se filtró y se almacenó en nitrógeno líquido para los análisis posteriores.

### **Análisis de $\text{H}_2\text{O}_2$ , Guayacol peroxidasa (G-POD), y EROS totales**

El análisis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular se realizó siguiendo un reporte previo (Chong, Abdullah, Fadzillah, Lai, y Lajis, 2005). Para esto, se tomó la biomasa y se maceró en frío con la adición de nitrógeno. Se tomaron 0.2 g de la biomasa y se homogenizaron con la adición de 2 ml de TCA 0.1% (p/v). El homogenizado se llevó a centrifugación por 15 min a 12000 gravedades. Luego se tomaron 0.5 ml del sobrenadante y se le agregaron 0.5 ml de buffer fosfato (pH = 7) y 1 ml de KI 1M. La absorbancia se leyó, después de 10 min de incubación, a 390 nm. El blanco se preparó de la misma manera, pero sin la adición del sobrenadante. La determinación de la concentración de peróxido en la muestra se realizó aprovechando el cambio de coloración producido por la oxidación del Yodo. Una curva de calibración se construyó previamente.

Para la determinación de la actividad G-POD se tomaron 0.3 g de biomasa macerada y se disolvieron en 2 ml de buffer fosfato 10 mM suplementado con polivinilpirrolidona (PVP) al 4% (p/v). Luego se centrifugó por 15 min a 12000 gravedades. Se tomaron  $60 \mu\text{l}$  del sobrenadante y se mezclaron con  $600 \mu\text{l}$  de guayacol 1% (v/v). Posteriormente, se adicionaron 2.2 ml de buffer fosfato 10 mM (pH = 7) y  $150 \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM. Finalmente, se leyó la absorbancia a 470 nm durante 10 min, comparando con un blanco preparado de la misma forma que la mezcla anterior, pero sin la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La actividad se determinó mediante la reacción entre el Guayacol, una sustancia incolora, y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que en presencia de G-POD produce tetraguayacol, una sustancia coloreada que se detecta espectrofotométricamente. Se usó la velocidad lineal inicial y un coeficiente de extinción molar de  $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  como indicador de la actividad de la G-POD. La cuantificación de EROS totales se realizó fluororimétricamente.

Todas las mediciones se realizaron por duplicado, tomando la biomasa de dos suspensiones celulares.

### Viabilidad celular y pH

Se utilizó el colorante eosina nigrosina para determinar la viabilidad celular. Las células teñidas se tomaron como no viables. El conteo se realizó por duplicado, contando 5 campos con al menos 150 células para determinar el porcentaje de viabilidad. De igual forma, se monitoreó el pH de las suspensiones durante los 5 días de muestreo.

### Extracción y cuantificación de peruvósidos

Para la extracción de peruvósidos totales (extra e intracelulares) se agregaron 5 ml de metanol a 5 ml de cultivo (medio y células) y se llevó a baño ultrasónico durante 20 minutos a 40°C. Luego, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. La biomasa restante se resuspendió en 10 ml de metanol y se centrifugó nuevamente. Las muestras se evaporaron y se filtraron con filtros de 0.2 µm para el posterior análisis.

La detección del peruvósido se realizó por High Performance Liquid Chromatography (HPLC), empleando una columna C-18, y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo/ agua (30:70) a un flujo de 0.5 ml min<sup>-1</sup>. Se realizó una curva de calibración usando el estándar comercial (Sigma/Aldrich St. Louis, MO, USA), que presentó en un tiempo de retención de 22.9 min.

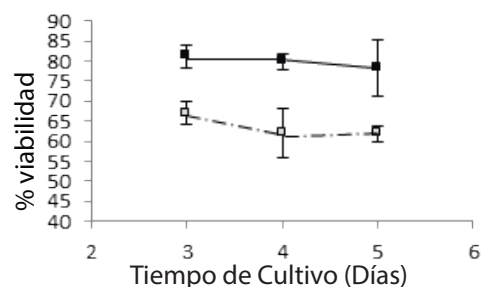
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Viabilidad celular y pH

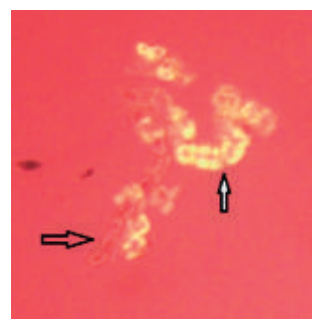
La adición de MeJa al cultivo no produjo cambios en el pH en ninguno de los ensayos. El pH se mantuvo entre 5.6 y 5.8 durante los primeros días de cultivo, por lo que la inhibición

en el crecimiento celular que se obtuvo en trabajos previos (datos no publicados) no se puede atribuir a la variación del pH por la adición del elicitor. En otras líneas celulares se han reportado aumentos en el pH cuando se adiciona MeJa al cultivo (Perassolo, Quevedo, Busto, Giulietti y Talou, 2011). La alcalinización del medio es una consecuencia de la despolarización de la membrana por la acción del elicitor y el consecuente aumento del intercambio de iones como el K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y Ca<sup>+2</sup> (Zhao, Davis y Verpoorte, 2005). Sin embargo, en nuestro caso no se encontraron cambios en el pH que puedan dar evidencias del aumento en el flujo de estos iones.

En la figura 1 se muestra el efecto del MeJa sobre la viabilidad celular, utilizando eosina nigrosina (Figura 2).



**Figura 1.** Porcentaje de viabilidad de los cultivos elicitados (cuadro sin relleno) y el control (cuadro con relleno sólido) durante los primeros 5 días de cultivo.



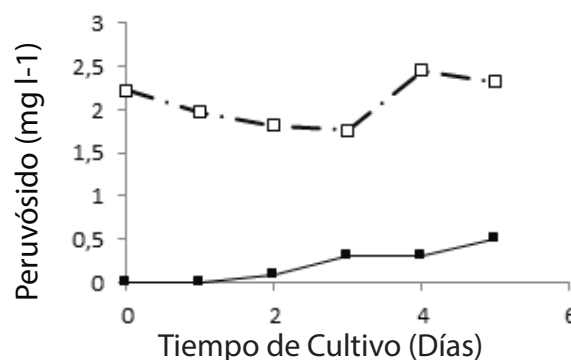
**Figura 2.** Tinción con eosina nigrosina de células de *T. peruviana*. El colorante permite distinguir células viables (blancas, flecha sólida) de las no viables (rojas, flecha sin relleno).

La viabilidad en las células no tratadas se mantuvo durante los 5 primeros días de cultivo en valores cercanos al 80%, pero en las células tratadas con MeJa se redujo a valores cercanos al 60% en el quinto día de cultivo (Figura 1). Este resultado es consistente con la pérdida en la capacidad de crecimiento de las células que se reportó previamente en los tratamientos con MeJa. En general, la inhibición del crecimiento celular y la reducción de la viabilidad son eventos comunes a la elicitación. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados para otras líneas celulares elicidadas con MeJa, en los que la pérdida de la viabilidad coincide con la reducción en las velocidades específicas de crecimiento y en la biomasa seca total (Patil, Lenka, Normanly, Walker y Roberts, 2014). La disminución en el porcentaje de viabilidad sugiere un aumento en los daños de las membranas celulares como consecuencia del aumento del potencial de membrana y el cambio en el flujo de iones señalados anteriormente. Sin embargo, la pérdida en la viabilidad no se podría explicar de esta manera considerando los resultados obtenidos en el pH, que se mantuvo en un valor más o menos constante y no se alcalinizó, como inicialmente habría de esperarse. De esta forma, es posible que un factor distinto al cambio del potencial de la membrana debido al flujo de iones sea el causante de los daños en la membrana y, por ende, en la reducción observada en la viabilidad. La presencia de EROS, en especial del ion hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), es un evento que desencadena la peroxidación lipídica (Gill y Tuteja, 2010), por lo que un aumento en la producción de estas especies por la presencia de un elicitor puede ser una de las razones que explican esta disminución en la viabilidad sin la previa alcalinización del medio de cultivo y la despolarización de la membrana.

### Producción de peruvósidos

En la figura 3 se muestra el efecto de la adición

de MeJa ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ) sobre la producción de peruvósido. En los cultivos no tratados, no se detectó producción del metabolito los dos primeros días de cultivo. La concentración máxima alcanzada en este caso fue de tan sólo  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  en el día 5. A diferencia de los cultivos no tratados, en los cultivos elicitados con MeJa se consiguió una producción de  $2.2 \text{ mg l}^{-1}$  al inicio del cultivo.



**Figura 3.** Producción de peruvósido en cultivos elicitados con MeJa (cuadro sin relleno) y en el control (cuadro con relleno sólido) durante los primeros 5 días de cultivo.

El efecto de la adición de MeJa fue inmediato: con tan sólo cuatro horas después de ser agregado al cultivo, se logró pasar de  $0 \text{ mg l}^{-1}$  de peruvósido en el control a  $2.2 \text{ mg l}^{-1}$ . Así mismo, la máxima concentración se alcanzó el día 4, con  $2.4 \text{ mg l}^{-1}$ .

Los resultados obtenidos coinciden con un reporte previo, en el que se demostró la capacidad del MeJa en la inducción del peruvósido (Zabala et al., 2010), y con los obtenidos en una experiencia reciente (datos no publicados), en la que se logró aumentar la producción de peruvósido 2.5 veces respecto al control. De esta forma, se demuestra que en los cultivos de *T. peruviana*, el MeJa actúa como segundo mensajero en la respuesta ante factores de estrés externos, y más aún, que la adición exógena de esta sustancia puede

simular condiciones de estrés que provocan cambios fisiológicos celulares que la célula ejecutaría en condiciones de presión reales, como por ejemplo, la acumulación de metabolitos secundarios como el peruvósido.

En general, el MeJa estimula la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios sin ninguna especificidad. Se ha encontrado que este elicitor puede promover la síntesis de flavonoides, terpenoides, esteroides, alcaloides, fenilpropanoides y otra gran variedad de metabolitos (Goyal, Lambert, Cluzet, Mérillon y Ramawat, 2012). Cuando se detecta en la superficie de las células una señal de estrés, las células responden abriendo los canales iónicos de  $Ca^{2+}$ , activando proteínas del tipo G y estimulando la actividad fosfolipasa PLA2, que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos como la fosfatidilcolina (PC), cuyo producto, la lisofosfatidilcolina (LysoPC) es el precursor del MeJa. Una vez que la concentración de MeJa aumenta al interior de la células, puede transformarse en una gran variedad de oxilipinas cíclicas que interactúan con el DNA para activar la síntesis de metabolitos secundarios (Reverberi, Fabbri, & Fanelli, 2012). Estos mismos eventos se producen cuando el MeJa es agregado de manera exógena a los cultivos. A pesar de que no se realizaron estudios en ese sentido, es probable que el aumento en la síntesis de peruvósido obtenida en este estudio responda a un mecanismo similar al señalado anteriormente, en el que el MeJa agregado se transloca al interior de las células y sirve de precursor en la síntesis de otras oxilipinas que interactúan con el DNA para activar algún gen o grupo de genes involucrados en la ruta del mevalonato, que es la ruta a partir de la cual se sintetizan los glicósidos cardiotónicos. Se han reportado dos genes involucrados en la síntesis de glicósidos cardiotónicos: el gen P5 $\beta$ R y el P5 $\beta$ R2. Ambos genes codifican para la enzima progesterona 5 $\beta$  reductasa, que cataliza la conversión de la

progesterona en 5 $\beta$  pregnonana-3,20-diona, que es considerado el primer paso para la síntesis de los glicósidos cardiotónicos. El gen P5 $\beta$ R se expresa en condiciones normales, pero el P5 $\beta$ R2 se sobreexpresa sólo en condiciones de estrés como las altas temperaturas, el estrés salino y las heridas en los tejidos (Pérez, Moya, Tuñón y Gavidia, 2010). Este es entonces un gen que sólo se activa cuando las células responden al estrés, y podría ser un sitio sobre el cual, las oxilipinas como el MeJa actúan para estimular la producción del peruvósido y otros metabolitos secundarios. Se requieren estudios adicionales para confirmarlo, en especial porque no existen estudios que relacionen la expresión de este gen con el aumento en las concentraciones intracelulares de MeJa. Se conoce, sin embargo, que el  $H_2O_2$  y el etileno regulan la expresión de este gen (Pérez-Bermúdez et al., 2010).

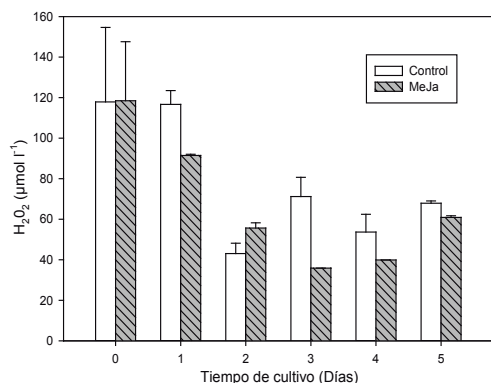
Las concentraciones de peruvósido reportadas en este estudio son más altas que las reportadas para la producción de otros glicósidos cardiotónicos en otras especies vegetales. Por ejemplo, en células en suspensión de *Digitalis purpurea* se reporta una concentración máxima de cardenólidos de 0.7 mg g<sup>-1</sup> de peso seco (Pérez-Bermúdez et al., 2010), mientras que para células de *Digitalis lanata* elicidadas con MeJa, se reporta una producción máxima de 200  $\mu$ g g<sup>-1</sup> (peso seco) (Pérez, Capote, Gerth y Jiménez, 2012). En un reporte de nuestro grupo, se logró obtener con células de *T. peruviana* tratadas con MeJa una concentración máxima de 8.93 mg l<sup>-1</sup> (Zabala, Angarita, Restrepo, Caicedo, & Perea, 2010b), un valor que se aleja bastante del obtenido en este estudio y que pone de manifiesto la alta variabilidad de los cultivos.

### Medición de $H_2O_2$ , Guayacol peroxidasa (G-POD), y EROS totales

En la figura 4 se muestran los resultados de la producción de  $H_2O_2$  durante los 5 primeros días de cultivo para las células elicidadas con MeJa y



para los tratamientos control.



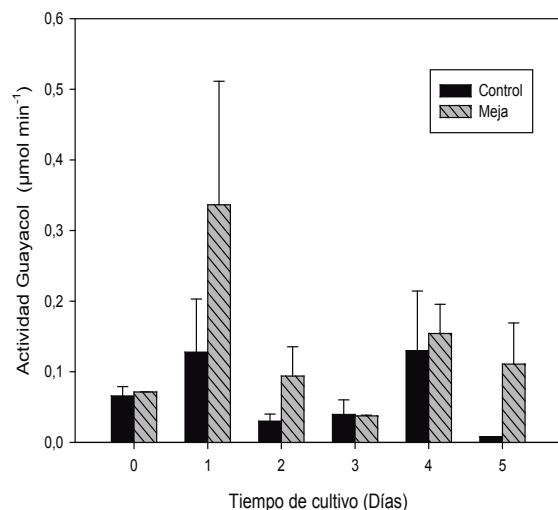
**Figura 4.** Producción H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivos elicitados con MeJA (100 mg l<sup>-1</sup>), durante los 5 primeros días de cultivo.

Salvo en los días 0 y 2, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue mayor en los cultivos no elicitados. En el día 0, no se encontraron diferencias significativas en la producción de peróxido entre ambos tratamientos. En el día 2, la concentración encontrada fue mayor en los cultivos elicitados. La mayoría de los reportes coinciden en señalar que la elicitación estimula la producción de EROS, en especial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y sugieren que esta especie actúa como segundo mensajero en la cascada de transducción de señales en respuesta a múltiples factores de estrés (Paranhos, Fernández y Corchete, 1999; Perassolo et al., 2011; Pérez et al., 2010; Reverberi et al., 2012; Zhao et al., 2005). Por ejemplo, en células de *Digitalis lanata* elicidadas con Chitoplan y Silioplant, se reportan aumentos en la producción de peróxido con respecto al control (Pérez et al., 2012). Lo mismo ocurre con los cultivos de *Digitalis thapsi*, en el que se reportan concentraciones de hasta 20 µmol l<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuando las células se tratan con Ca<sup>2+</sup> (Paranhos et al., 1999)]. Estos resultados no están de acuerdo con los obtenidos en nuestro caso, en el que el peróxido, en lugar de aumentar con la elicitación, disminuye. Sin embargo, el aumento del peróxido con la adición de

elicitors no es un evento generalizado. Se han reportado casos de elicitación con MeJA, en los que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye en relación con los cultivos no tratados (Pérez et al., 2012). En este punto, la respuesta del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende de la especie y de la concentración del elicitor.

A pesar de que se ha encontrado que el peróxido responde de manera bifásica después de la elicitación y que su concentración aumenta después de transcurridas tres horas de interacción entre la membrana y la señal de estrés (Zhao et al., 2005), el hecho de no haber encontrado diferencias significativas entre los cultivos control y los elicitados con MeJA el día cero de cultivo, indica que en el caso de *T. peruviana* la respuesta no sigue esta regla, ya que los análisis para este día se realizaron cuatro horas después de adicionado el elicitor, tiempo tras el cual deberían observarse diferencias en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre ambos cultivos.

En la figura 5 se muestran los resultados de la actividad de la G-POD. En este caso se observa, respecto al control, un aumento en la actividad de la G-POD en los cultivos elicitados con MeJA en los días 1, 2, 4 y 5, mientras que en los días 0 y el 3 no se encontraron diferencias entre los dos tratamientos. Resultados similares han sido encontrados en plantas de trigo expuestas a cadmio, en las que el estrés produce un aumento en la actividad G-POD y otras enzimas antioxidantes (Milone, Sgherri, Clijsters y Navari, 2003). De igual forma, se reportó que la adición de MeJA a cultivos de raíces de *Panax ginseng* estimula la actividad de esta enzima (Lu et al., 2001).



**Figura 5.** Actividad G-POD en cultivos elicitados con MeJA (100 mg l<sup>-1</sup>), durante los 5 primeros días de cultivo.

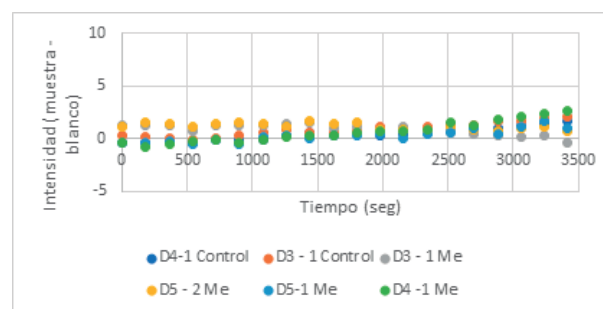
El aumento en la actividad de la G-POD en las células elicitadas con MeJA explica los menores niveles en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto a los niveles del control. Al aumentar la actividad G-POD, su sustrato se ve disminuido. De esta forma, el MeJA está actuando como un efector de la maquinaria antioxidante.

Los resultados de la figura 4, indican que hay una alta producción de peróxido en los cultivos no elicitados y que la adición del MeJA contribuye a la disminución de estas cantidades de peróxido mediante el aumento de la actividad antioxidante de la G-POD. De esta forma, los efectos de la elicitación con MeJA en *T. peruviana*, en relación con los eventos antioxidantes, parece inclinarse más hacia la actividad antioxidante que hacia la generación de especies reactivas como el peróxido. Esta hipótesis se ve reforzada cuando se considera el aumento en la producción de peróxido, lo que indica que se están activando rutas del metabolismo secundario que se activan sólo cuando las células responden a un tipo de estrés.

Varias razones conllevan a pensar que la

adición de MeJA en los cultivos de *T. peruviana* no estimula la producción de EROS, sino que, por el contrario, favorece la respuesta antioxidante. En primer lugar, porque el pH del medio se mantuvo constante y, como se mencionó anteriormente, la adición de elicitores generalmente desencadena la alcalinización del medio de cultivo. Cuando esto ocurre, se observa además que con la adición del elicitor se estimula también la formación de especies reactivas de oxígeno (Chong et al., 2005), que son las responsables de la oxidación de las membranas, de su despolarización y del subsecuente aumento en el flujo de iones y la alcalinización del medio. Que en este estudio el pH se haya mantenido constante, sugiere que la adición de MeJA no desencadena eventos oxidativos. Sumado a esto, está el hecho de que la adición de MeJA, lejos de estimular la producción de peróxido, lo redujo en comparación con las células no tratadas, mediante la activación de una enzima antioxidante como la G-POD.

Al estudiar la producción de EROS totales (Figura 6), se puede ver cómo la producción de estas especies es prácticamente nula (las pendientes de las curvas son cero o negativas), lo que apoya el argumento anterior.



**Figura 6.** Determinación de EROS totales por fluorescencia para diferentes días (D) de cultivo tratados con MeJA (Me).

Ahora bien, dos resultados parecieran ir en contra de la hipótesis del efecto antioxidante del MeJA; a pesar de que la inducción de un

metabolito secundario como el peruvósido produce que las células activen sus mecanismos de respuesta ante el estrés, muchos autores parecen coincidir en que la producción de EROS, y en especial de peróxido, es un suceso indispensable y de ocurrencia previa a la inducción del metabolismo secundario. Algunos estudios sugieren que el aumento de la síntesis de metabolitos secundarios no necesariamente debe estar mediada por la presencia de EROS (Zhao et al., 2005). Si se toma en cuenta esta última consideración, el aumento encontrado en la producción de peruvósido no necesariamente tuvo que estar asociado a la producción de EROS, lo que es consistente con los resultados del pH. Sin embargo, la pérdida en la viabilidad en la membrana y la reducción en el crecimiento celular, son sucesos que deben ser estudiados más a fondo.

Aunque la inhibición del crecimiento celular con la adición de MeJa puede explicarse asumiendo que las células entran en un estado de latencia, la pérdida en la viabilidad de la membrana en los cultivos elicitados no es fortuita, y deben investigarse a fondo sus posibles causas.

Así bien, los resultados obtenidos en este estudio sientan bases para la acción del MeJa como detonante de la respuesta antioxidante en cultivos de *T. peruviana*, pero aún existen interrogantes en cuanto a la relación que existe entre la elicitación, la respuesta antioxidante y la acumulación de metabolitos con esta especie vegetal que aborda la elicitación desde un enfoque bioquímico.

## CONCLUSIONES

- El MeJa puede ser utilizado como un elicitador efectivo para la producción de peruvósido en cultivos de *T. peruviana*.

- El MeJa estimula la defensa oxidante en cultivos de *T. peruviana* mediante la promoción de la actividad de la G-OPD y la reducción en los niveles de EROS.
- La adición de MeJa no desencadena la producción de EROS.
- El aumento en la producción de peruvósido en cultivos de células de *T. peruviana* elicitados con MeJa 100 mg l<sup>-1</sup>, el día cero de cultivo, no está mediado por la presencia de EROS.

## RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar más estudios para dilucidar los mecanismos por los cuales la adición de MeJa reduce la viabilidad de los cultivos de *T. peruviana*.
- Se sugiere investigar la producción de EROS y G-POD en periodos de tiempos más cortos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, F., Iwase, Y., Yamauchi, T., Yahara, S., & Nohara, T. (1995). Flavonol sinapoyl glycosides from leaves of *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry*, 40(2), 577-581. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00316-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00316-Y)
- Aftab, T., Khan, M. M. A., Idrees, M., Naeem, M., Moinuddin y Hashmi, N. (2011). Methyl jasmonate counteracts boron toxicity by preventing oxidative stress and regulating antioxidant enzyme activities and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Protoplasma*, 248(3), 601-612. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0218-5>
- Ali, M. B., Yu, K.-W., Hahn, E.-J y Paek, K.-Y. (2006a). Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Reports*, 25(6), 613-620. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0065-6>

Brodelius, P. E. (1996). Elicitation of Cultivated Plant Cells as a Tool in Biotechnology and Basic Biochemistry. En E. E. Bittar, B. Danielsson y L. Bülow (Eds.), *Advances in Molecular and Cell Biology* (Vol. 15, pp. 319-340). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1569-2558\(08\)60321-5](https://doi.org/10.1016/S1569-2558(08)60321-5)

Chong, T. M., Abdullah, M. A., Fadzillah, N. M., Lai, O. M y Lajis, N. H. (2005). Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 469-477. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.11.002>

Chong, Tzer Miin, Abdullah, M. A., Lai, O. M., Nor'Aini, F. M y Lajis, N. H. (2005). Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochemistry*, 40(11), 3397-3405. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.028>

Corrêa, M. P., Penna, L. de A. (1985). *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.

Dörnenburg, H y Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(8), 674-684. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00108-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00108-4)

Gill, S. S y Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

Goyal, S., Lambert, C., Cluzet, S., Mérillon, J. M y Ramawat, K. G. (2012). Secondary Metabolites and Plant Defence. En J. M. Mérillon & K. G. Ramawat (Eds.), *Plant Defence: Biological Control* (pp. 109-138). Springer Netherlands. Recuperado de <http://link.springer.com/chapter/10.1007/>

[/978-94-007-1933-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0_5)

Haux, J. (1999). Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. *Medical Hypotheses*, 53(6), 543-548. <https://doi.org/10.1054/mehy.1999.0985>

Jabs, T., Dietrich, R. A y Dangl, J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5283), 1853-1856.

Kang, S.-M., Min, J.-Y., Kim, Y.-D., Kang, Y.-M., Park, D.-J., Jung, H.-N y Choi, M.-S. (2006). Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42(1), 44-49. <https://doi.org/10.1079/IVP2005719>

Khare, C. P. (2007). *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. New York: Springer-Verlag.

Kohls, S., Scholz-Böttcher, B. M., Teske, J., Zark, P y Rullkötter, J. (2012). Cardiac glycosides from Yellow Oleander (*Thevetia peruviana*) seeds. *Phytochemistry*, 75, 114-127. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.11.019>

Kumar, A. (1992). Somatic embryogenesis and high frequency plantlet regeneration in callus cultures of *Thevetia peruviana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 31(1), 47-50. <https://doi.org/10.1007/BF00043474>

Lu, M., Wong, H y Teng, W. (2001). Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell Reports*, 20(7), 674-677. <https://doi.org/10.1007/s002990100378>

Milone, M. T., Sgherri, C., Clijsters, H y Navari-Izzo, F. (2003). Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 50(3), 265-276. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(03\)00037-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(03)00037-6)

Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J y Ryan, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 13(1), 179-191.

Paranhos, A., Fernández-Tárrago, J y Corchete, P. (1999). Relationship between active oxygen species and cardenolide production in cell cultures of *Digitalis thapsi*: effect of calcium restriction. *New Phytologist*, 141(1), 51-60. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00317.x>

Patil, R. A., Lenka, S. K., Normanly, J., Walker, E. L y Roberts, S. C. (2014). Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured *Taxus* cells. *Plant Cell Reports*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1632-5>

Pauw, B., van Duijn, B., Kijne, J. W y Memelink, J. (2004). Activation of the oxidative burst by yeast elicitor in *Catharanthus roseus* cells occurs independently of the activation of genes involved in alkaloid biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 55(6), 797-805. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-1968-2>

Perassolo, M., Quevedo, C. V., Busto, V. D., Giulietti, A. M y Talou, J. R. (2011). Role of reactive oxygen species and proline cycle in anthraquinone accumulation in *Rubia tinctorum* cell suspension cultures subjected to methyl jasmonate elicitation. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 49(7), 758-763. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.03.015>

Pérez-Alonso, N., Capote, A., Gerth, A y Jiménez, E. (2012). Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 110(1), 153-162. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0139-4>

Pérez-Bermúdez, P., Moya García, A. A., Tuñón, y Gavidia, I. (2010). *Digitalis purpurea* P5 $\beta$ R2, encoding steroid 5 $\beta$ -reductase, is a novel

defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis. *New Phytologist*, 185(3), 687-700. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03080.x>

Ram, M., Prasad, K. V., Singh, S. K., Hada, B. S y Kumar, S. (2013). Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113(3), 459-467. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0287-1>

Ramachandra Rao, S y Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1)

Reverberi, M., Fabbri, A. A y Fanelli, C. (2012). Oxidative Stress and Oxylipins in Plant-Fungus Interaction. En G. Witzany (Ed.), *Biocommunication of Fungi* (pp. 273-290). Springer Netherlands. Schenk, R. U y Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199-204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>

Sharma, A y Kumar, A. (1994). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf-derived cell suspension of a mature tree - *Thevetia peruviana* L. *Plant Cell Reports*, 14(2-3), 171-174. <https://doi.org/10.1007/BF00233784>

Sivanandhan, G., Rajesh, M., Arun, M., Jeyaraj, M., Kapil Dev, G., Arjunan, A y Ganapathi, A. (2013). Effect of culture conditions, cytokinins, methyl jasmonate and salicylic acid on the biomass accumulation and production of withanolides in multiple shoot culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal using liquid culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3), 715-728. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1112-x>

Smith, J. A., Madden, T., Vijjeswarapu, M y Newman, R. A. (2001). Inhibition of export of

fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvitzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. *Biochemical Pharmacology*, 62(4), 469-472.

Stenkvist, B. (1999). Is digitalis a therapy for breast carcinoma? *Oncology Reports*, 6(3), 493-496.

Suvarnalatha, G., Rajendran, L., Ravishankar, G. A y Venkataraman, L. V. (1994). Elicitation of anthocyanin production in cell cultures of carrot (*Daucus carota* L) by using elicitors and abiotic stress. *Biotechnology Letters*, 16(12), 1275-1280. <https://doi.org/10.1007/BF00149631>

Vaklavas, C., Chatzizisis, Y. S y Tsimberidou, A. M. (2011). Common cardiovascular medications in cancer therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics*, 130(2), 177-190. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.009>

Vasconsuelo, A y Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172(5), 861-875. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.01.006>

Villa, F. A., Hormaza, A. y Zabala, M.A. (2011). Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en *Thevetia peruviana*. *Scientia Et Technica*, XVI(49), 298-303.

Wolucka, B. A., Goossens, A y Inzé, D. (2005). Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 56(419), 2527-2538. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri246>

Zabala, M. A., Angarita, M., Restrepo, J. M., Caicedo, L. A y Perea, M. (2010). Elicitation with methyl - jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(3), 233-238. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9249-z>

Zhao, J., Davis, L. C y Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>.