



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRICTOSIDINA β -GLUCOSIDASA Y
SU PAPEL EN LA BIOSÍNTESIS DE ALCALOIDES INDOL-
TERPÉNICOS EN CULTIVOS DE *Uncaria tomentosa***

Tesis que presenta
Ileana Vera Reyes

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de tesis:

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia

México, D.F.

Junio 2013.

*El presente trabajo se llevó a cabo en el
Departamento de Biotecnología y
Bioingeniería del Centro de Investigación
y de Estudios Avanzados del IPN bajo la
dirección de Dra. Ana C. Ramos Valdivia*

Agradecimientos

A todo mi Comité Tutorial, los doctores Ana C. Ramos Valdivia, Ma. Teresa Ponce Noyola, Gabriela Trejo Tapia, Carlos M. Cerda-García Rojas, Fernando J. Esparza García y a Josefina Flores-Sanchez quienes me brindaron sus consejos, tiempo y orientación en el desarrollo de trabajo.

A la M. en C. Gabriela Luna Palencia, auxiliar de investigación del Laboratorio de Biotecnología de Células Vegetales. Por su amistad, ayuda y apoyo técnico. A Carmen Fontaine, técnico del Laboratorio de Biotecnología de Células Vegetales.

Al CONACYT por la beca 173034 otorgada en el periodo Agosto 2008-Agosto 2012 y por el financiamiento para la realización de este trabajo (Proyecto105019).

Índice Figuras.....	iii
Índice de tablas.....	vi
Abreviaturas	vii
Resumen.....	ix
Abstract	xi
1. Introducción.....	1
1.1 <i>Uncaria tomentosa</i>	3
1.1.1 <i>Alcaloides en Uncaria tomentosa</i>	4
1.1.2 <i>Antecedentes de cultivos in vitro</i>	5
1.2 Biosíntesis de alcaloides indolterpénicos.....	6
1.2.1 <i>β-Glucosidasas de plantas</i>	9
1.2.2 <i>Estrictosidina β-D-glucosidasa</i>	10
1.2.3 <i>Biosíntesis de AOM en Uncaria tomentosa</i>	14
1.3 Elictores y señales de transcripción.....	16
1.4 Estrés oxidativo.....	20
3. Hipótesis	23
4. Objetivos	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos particulares	23
5. Materiales y Métodos	24
5.1 Material Vegetal	24
5.1.1 <i>Medio y condiciones de cultivo para mantenimiento y crecimiento</i>	24
5.1.2 <i>Elicitación de cultivo de raíces (UTr-3) con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o butionina sulfoximina-ácido jasmónico (BSO-JA) en matraz.</i>	24
5.1.3 <i>Cultivos celulares en biorreactor</i>	25
5.2 Extracción diferencial de alcaloides	25
5.2.1 <i>Cuantificación de alcaloides</i>	26
5.2.2 <i>Identificación de compuestos por cromatografía en placa de alta definición (HPTLC)</i>	26
5.3 Extracción de proteína.....	27
5.3.1 <i>Extracción de proteína mediante precipitación ácida.</i>	27
5.4 Actividad de enzimas antioxidantes	28
5.4.1 <i>Actividad enzimática de guayacol peroxidasa</i>	28
5.4.1.1 <i>Zimogramas de guayacol peroxidasa</i>	28
5.4.2 <i>Actividad enzimática de glutatión reductasa</i>	28
5.4.2.1 <i>Zimogramas de glutatión reductasa</i>	28
5.4.3 <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)</i>	29
5.5 Actividad de enzimas del metabolismo secundario	29
5.5.1 <i>Actividad de strictosidina sintasa (STR)</i>	29
5.5.2 <i>Producción de dolicanósido</i>	30
5.6 Actividad de strictosidina β -glucosidasa (SGD).....	31
5.6.1 <i>Cuantificación SGD por HPLC</i>	31
5.6.2 <i>Cuantificación de la actividad de la SGD por glucosa liberada</i>	31
5.7 Análisis bidimensional de proteínas.....	31

5.7.1 Isoelectroenfoque.....	32
5.7.2 Separación de proteínas en una segunda dimensión.....	33
5.8 Purificación de la estrictosidina β -glucosidasa.....	33
5.9 Clonación del cDNA de la estrictosidina β -glucosidasa	35
5.9.1 Obtención RNA total hojas.....	35
5.9.2 Obtención RNA total raíces.....	35
5.9.3 Amplificación de cDNA por extremos terminales (RACE).....	35
5.9.4 Análisis de transcritos.....	37
6. Resultados y Discusión	38
6.1 Estudio de las enzimas involucradas en la biosíntesis de alcaloides en cultivos de raíces de <i>U. tomentosa</i>	38
6.1.1 Efecto de la elicitación con H ₂ O ₂ o BSO-JA en el crecimiento de raíces.....	38
6.1.2 Respuestas enzimáticas antioxidantes bajo condiciones de estrés oxidativo.....	40
6.1.3 Efecto del H ₂ O ₂ en las actividades de enzimas relacionadas a estrictosidina, sus niveles de transcritos y la producción de alcaloides.....	43
6.1.4 Efecto del BSO-JA en las actividades de enzimas relacionadas a estrictosidina, sus niveles de transcrito y la producción de alcaloides.....	45
6.1.5 Conversión enzimática de N- ω -metiltriptamina y secologanina en dollicantósido	49
6.2 Purificación de la estrictosidina β -glucosidasa a partir de cultivos de células en suspensión de <i>U. tomentosa</i>	52
6.2.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la SGD de <i>U. tomentosa</i>	55
6.2.2 Inhibición de la actividad de la SGD de <i>U. tomentosa</i> por la presencia de D (+) ácido glucónico- δ -lactona	56
6.2.3 Determinación de los parámetros cinéticos de la SGD de <i>U. tomentosa</i>	57
6.2.4 Identificación de los productos de reacción de la SGD de <i>U. tomentosa</i>	59
6.3 Clonación y caracterización del cDNA completo que codifica para <i>Ut_PSGD</i> de <i>U. tomentosa</i>	64
6.3.1 Amplificación del cDNA completo de la <i>Ut_PSGD</i>	68
6.3.2 Distribución de la actividad de SGD en diferentes tejidos de <i>U. tomentosa</i>	76
6.4 Perfil proteómico de raíces de <i>U. tomentosa</i> elicidadas con BSO-JA.....	78
7. Conclusiones	92
8. Recomendaciones	93
9. Referencias	94
10. Anexos	111
10.1 Curvas estándar para cuantificación.....	111
10.2 Soluciones extracción RNA técnica de Lio <i>et al.</i> , 2004.....	112

Índice Figuras

- Figura 1.** Alcaloides producidos por la raíz de *U. tomentosa* en cultivos *in vitro*. A) mitrafilina, B) isomitrafilina, C) isorincofilina, D) 3- α -dihidrocadambina y E) dolicantósido. _____ 6
- Figura 2.** Primer paso en la formación de los alcaloides indolterpénicos. _____ 7
- Figura 3.** Tipos de alcaloides indolterpénicos derivados de la strictosidina (Szabó, 2008b). _____ 8
- Figura 4.** Intermediarios en la hidrólisis de la strictosidina en *C. roseus* y en la biosíntesis de los alcaloides *aspidosperma* e *iboga*. _____ 11
- Figura 5.** Estructura de la SGD de *Rauvolfia serpentina*. Adaptada de Barleben et al., 2000. _____ 14
- Figura 6.** Biosíntesis de alcaloides indolterpénicos (AIT), 3- α -dihidrocadambina (DHC) y alcaloides oxindólicos (AOM) en cultivo de raíces de *U. tomentosa*. STR, strictosidina sintasa; SGD, strictosidina β -glucosidasa; MEP, ruta del mevalonato; AI, alcaloides indólicos; AOM, alcaloides oxindólicos monoterpénicos. _____ 16
- Figura 7.** Percepción del estrés biótico o abiótico. Se encuentran implicados eventos como el estallamiento oxidativo. Éstos estimulan el flujo de Ca^{2+} , dentro del citoplasma, el cual activa NADPH oxidasas, por activación de NAD quinasa; así mismo activa peroxidasas de la pared celular y otras enzimas relacionadas. El H_2O_2 puede tener diferentes destinos entre los más importantes: 1) La activación de señales de transducción; sea mediante su transporte a través de la membrana actuando directamente como una molécula señal o regenerando moléculas oxidadas tal como la ascorbato. 2) El flujo de H_2O_2 estaría además induciendo la expresión de genes específicos y activar la producción de metabolitos secundarios; 3) Los niveles de H_2O_2 están determinados tanto por su producción como su metabolismo, vía catalasa o su participación en el ciclo glutatión-ascorbato. Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APx), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), monodehidroascorbato reductasa (MDAR), radical superóxido (O_2^-), monodehidroascorbato (MDA), dehidroascorbato (DHA), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), nucleótidos de adenina reducidos (NADPH), nucleótidos de adenina oxidados (NADP⁺). _____ 18
- Figura 8.** Efecto de la adición de elicitores en el crecimiento y viabilidad de raíces de *U. tomentosa*. Raíces sin tratar (■, A); tratamiento con H_2O_2 (○, B), con BSO-JA (▲, C). La foto de viabilidad es del día 8, después de la adición de los tratamientos. La adición de los elicitores se realizó a los 13 días de cultivo cuando las raíces se encontraban en fase de crecimiento exponencial. _____ 39
- Figura 9.** Actividades enzimáticas: **A)** guayacol peroxidasa (POD); **B)** glutatión reductasa (GR), cultivos control (□) y 0, 3, 5, 8 días después de la adición de H_2O_2 () o BSO-JA (■). _____ 40
- Figura 10.** Zimogramas de extractos proteicos de cultivos de raíces de *U. tomentosa*, mostrando las isoformas de glutatión peroxidasa (POD) y glutatión reductasa (GR). Las isoformas a los días 3, 5 y 8 de raíces sin tratamiento (control), elicitadas con H_2O_2 ó BSO-JA. _____ 41
- Figura 11.** Esquema del mecanismo de activación del metabolismo secundario a través de transducción de señales causada por estrés oxidativo en raíces de *U. tomentosa*. La adición de elicitadores H_2O_2 o BSO-JA, causa una cascada de señales las cuales pueden ser: Inducción del flujo intracelular de Ca^{2+} , este a su vez causa la activación de peroxidasas, NADPH oxidasa y de fosfolipasas, que además van a generar otras moléculas señal, como ERO's y JA (Zhao et al, 2005). Todos estos mensajeros van a trabajar interaccionando para inducir la biosíntesis de AIT en *C. roseus* (Memelink et al., 2001). Por otro lado, se sabe que las ERO's activan a moléculas antioxidantes por excelencia como el ascorbato y glutatión (Quan et al., 2008); los cuales al no poder regenerarse en la célula, por la disminución de la concentración del glutatión causada por el BSO, va a provocar un incremento en las ERO's. Mismas que estarían activando la producción de compuestos antioxidantes (Guo y Ohta, 1993) como fenoles y alcaloides (metabolitos secundarios) y de esta manera mantener el equilibrio redox en la célula (Ramos-Valdivia et al., 2012). Especies reactivas de oxígeno (ERO's), jasmonatos (JA), Superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), monodehidroascorbato reductasa (MDAR), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dehidroascorbato (DHA), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), nucleótidos de adenina reducidos (NADPH), nucleótidos de adenina oxidados (NADP⁺). _____ 42
- Figura 12.** Efecto de la adición de H_2O_2 en raíces de *U. tomentosa* cultivadas en matraces Erlenmeyer. A) Producción de AOM (■); 3- α -dihidrocadambina (▲); y dolicantósido (Δ). B) Actividades

específicas de STR (○) y SGD (●). La adición de los elicitores se realizó a los 13 días de cultivo cuando las raíces se encontraban en fase de crecimiento exponencial. _____44

Figura 13. Efecto de elicitores en los niveles de transcritos de los genes STR y SGD mediante RT-PCR semi-cuantitativa, en cultivos de raíces de *U. tomentosa*. A) Los productos amplificados (0, 6, 12, 48 and 192 h) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (306 nm). Se muestra una imagen inversa del gel teñido. B) Representación gráfica de los resultados de la RT-PCR, las unidades son arbitrarias, adición de H₂O₂ (○) o BSO-JA (■). El análisis representado en las barras fue utilizando los valores promedio del análisis por triplicado de la RT-PCR. Los resultados representan el incremento con respecto a las raíces no tratadas. _____45

Figura 14. Efecto de la adición de BSO-JA en raíces de *U. tomentosa* cultivadas en matraces Erlenmeyer. A) Producción de AOM (■); 3 α -dihidrocadambina (▲); y dolicanósido (Δ). B) Actividades específicas de STR (○) y SGD (●). La adición de los elicitores se realizó a los 13 días de cultivo cuando las raíces se encontraban en fase de crecimiento exponencial. _____47

Figura 15. Cultivos de raíces sin tratamiento (controles) de *U. tomentosa* cultivadas en matraces Erlenmeyer. A) Producción de AOM (■); 3 α -dihidrocadambina (▲); y dolicanósido (Δ). B) Actividades específicas de STR (○) y SGD (●). _____48

Figura 16. A) Cromatograma de líquidos de alta resolución con arreglo de diodos del producto de reacción entre la *N*- ω -metiltriptamina y la secologanina en presencia de un extracto proteico semipurificado de raíces de *U. tomentosa*. Trazo superior: extracto proteico; trazo central: *N*- ω -metiltriptamina (1) como sustrato; trazo inferior: productos de reacción (2-4) y sustrato remanente (1). (B) Cromatograma de iones totales (TIC) de los productos de la reacción enzimática. (C-F) Espectros de masas por electroespray (ESI) de la *N*- ω -metiltriptamina (1) que muestran al ión [M+1]⁺ en m/z 175, un derivado del dihidrodolicantósido (2) que muestra al ión [M+1]⁺ en m/z 547, un derivado del isodolicantósido (3) con [M+1]⁺ en m/z 545 y el dolicanósido (4) con [M+1]⁺ en m/z 545. _____51

Figura 17. Purificación de estrictosidina β -glucosidasa (SGD) de células en suspensión de *U. tomentosa* elicidadas con H₂O₂. A) Primer paso de cromatografía de intercambio aniónico; B) Segundo paso de cromatografía de intercambio aniónico. _____ UV, absorbencia a 280 nm; --- Actividad enzimática de la SGD en pKat/mg; ____ Gradiente de NaCl. _____53

Figura 18. Fracciones obtenidas del proceso de purificación de la estrictosidina β -glucosidasa de *U. tomentosa*. Gel electroforético del 12 % (SDS-PAGE). M, marcador de peso molecular; 1, Extracto crudo; 2, fracción del 45 %; 3, ultrafiltración; 4, Primer paso de cromatografía columna HiTrap Q FF; 5, Segundo paso de cromatografía columna HiTrap Q FF. Tinción del gel con SYPRO® Ruby. _____54

Figura 19. Secuencia de aminoácidos encontrada en la SGD purificada de *U. tomentosa*. Comparada con secuencias de aminoácidos de la SGD de *Uncaria tomentosa* (Ut_PSGD, n° de acceso, JQ3666085) y con secuencias de aminoácidos de otras plantas, *Catharanthus roseus* (Cr_SGD, n° de acceso, Q9M7N7); *Rauvolfia serpentina*, (Rs_SGD, n° de acceso, Q8GU20); *Rauvolfia serpentina*, rauciffricine β -glucosidasa (Rs_RGD, n° de acceso, Q9SPP9); *Psychotria ipecacuana*, β -glucosidasa (Ipeg1, n° de acceso, B6ZKM7); *Camptotheca acuminata*, supuesta SGD (Ca_PSGD, n° de acceso, JF508379). En los cuadros rojos se señala la secuencia de aminoácidos encontrada. _____55

Figura 20. Actividad de la estrictosidina β -glucosidasa en relación con el pH del utilizado en la reacción (los amortiguadores se prepararon a una concentración de 100mM). _____56

Figura 21. Determinación de los parámetros cinéticos de la SGD de *U. tomentosa* con estrictosidina; A) Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción, cinética de Michaelis-Menten; B) Representación Lineweaver-Burk; C) Representación Hanes-Woolf. _____58

Figura 22. TLC identificación de catenamina Rf 0.59, fase móvil CHCl₃: EtOH (30:1). A) Placa de TLC a 264 nm B) Placa de TLC a 366 nm. BE, blanco enzima; Rx; reacción _____60

Figura 23. Propuesta de producción de alcaloides oxindólicos a partir de estrictosidina. Adaptada de Szabó (2008b). _____61

Figura 24. Propuesta del compuesto formación que da el pigmento de color amarillo durante la reacción de la SGD (Geerlings, 1999). _____62

Figura 25. TLC identificación de 5,6-dihidroflavopereirina fase móvil *n*-butanol:ácido-acético:agua (4:1:1) Rf = 0.6; A) Placa de TLC a 264 nm B) Placa de TLC a 366 nm. BE, blanco enzima; Rx; reacción. _____63

Figura 26. HPTLC de los productos de reacción de la SGD de *U. tomentosa*, fase móvil CHCl₃: MeOH (4:1). A) Placa de HPTLC a 264 nm, se indica con cuadro rojo a la estrictosidina Rf 0.36 B) Placa de

HPTLC a 366 nm; se indica con cuadro rojo a la catenamina Rf 0.46. BS, blanco de sustrato (solo estrictosidina); Rx1, Tiempo de reacción una hora; B1, blanco enzima tiempo 1 hora; Rx3, Tiempo de reacción de 3 horas; B3, blanco enzima tiempo tres horas; Rx24, Tiempo de reacción 24 horas; B24, blanco enzima tiempo 24 horas.	63
Figura 27. RNA total de <i>U. tomentosa</i> extraído con Trizol. 1) raíz; 2) tallo; 3) hoja; M, Marcador 1Kb plus; gel de agarosa al 1.5%.	65
Figura 28. Producto de PCR en geles de agarosa 1.5% del gen <i>Ut_PSGD</i> de <i>U. tomentosa</i> . 1) Hoja; 2) Tallo; M, Marcador 1Kb plus.	66
Figura 29. Digestión de plásmido pGEM-T Easy. Enzimas utilizadas <i>SphI</i> y <i>PstI</i> . M, Marcador 1Kb plus; 1-11, Plásmidos digerido.	66
Figura 30. Plásmidos seleccionados que fueron purificados para secuenciar 1,7,8,9; M, Marcador 1Kb plus.	67
Figura 31. Diagrama de la posición de los oligonucleótidos diseñados.	68
Figura 32. Diagrama de la obtención cDNA completo de la SGD por PCR. F1, oligonucleótido sentido degenerado; R1, oligonucleótido reverso degenerado; GSP1, oligonucleótido sentido específico para el gen; GSP2, oligonucleótido reverso específico para el gen. RACE, rápida amplificación de cDNA por extremos terminales.	69
Figura 33. Amplificación de fragmentos SGD <i>U. tomentosa</i> . M, Marcador 1Kb plus; 1, Extremo 5' del gen; 2-4, Controles negativos de la reacción; 4, Extremo 3' del gen; 5, Secuencia completa (5-3).	69
Figura 34. Plásmidos con inserto técnica RACE en <i>U. tomentosa</i> . M, marcador 1 Kb plus; 1, control Positivo; 2, Extremo 5' del gen; 3, Extremo 3' del gen; 4, Secuencia completa del gen (5-3); 5, Plásmido sin inserto.	70
Figura 35. Secuencia de nucleótidos (2538 pb) y secuencia de aminoácidos (533 aminoácidos) del cDNA completo que codifica para una supuesta estrictosidina β -glucosidasa de <i>Uncaria tomentosa</i> . Los aminoácidos subrayados indican los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones (R1-F2 para la obtención de un fragmento cDNA; GSP1-GSP2, utilizados en la técnica RACE). El codón de paro se indica con un asterisco (*).	72
Figura 36. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la SGD de <i>Uncaria tomentosa</i> (<i>Ut_PSGD</i> , nº de acceso, JQ3666085) con secuencias de aminoácidos de otras plantas, <i>Catharanthus roseus</i> (<i>Cr_SGD</i> , nº. de acceso, Q9M7N7); <i>Rauvolfia serpentine</i> , (<i>Rs_SGD</i> , nº. de acceso, Q8GU20); <i>Rauvolfia serpentine</i> , rauciffricine β -glucosidasa (<i>Rs_RGD</i> , nº. de acceso, Q9SPP9); <i>Psychotria ipecacuana</i> , β -glucosidasa (<i>Ipeglu1</i> , nº de acceso, B6ZKM7); <i>Camptotheca acuminata</i> , supuesta SGD (<i>Ca_PSGD</i> , nº de acceso, JF508379).	73
Figura 37. Estructura en 3D de la estrictosidina β -glucosidasa de <i>Uncaria tomentosa</i> (<i>Ut_PSDG</i>).	75
Figura 38. Árbol filogenético análisis de <i>Ut_PSGD</i> de <i>U. tomentosa</i> con <i>C. rosues</i> (AF112888.1), <i>R. serpentina</i> (AF149311.1), <i>R. serpentina</i> (AJ302044), <i>P. ipecacuana</i> (AB455580.1), <i>C. acuminata</i> (AES93119), <i>A. lyrata</i> (GL348715.1), <i>A. thaliana</i> (NP_200268), <i>C. orientalis</i> (HM559226.1), <i>R. communis</i> (EQ974044.1), <i>Glycine max</i> (AB259819.1), <i>L. japonicus</i> (EU710844.2).	76
Figura 39. Comparación del patrón electroforético en geles (SDS-PAGE) al 12 %, de extractos de raíces de <i>U. tomentosa</i> . 1) Utilizando con un amortiguador comercial (Rehydration buffer); 2) El amortiguador comercial adicionado con 2M de tiourea; M, marcador.	79
Figura 40. Geles en 2D-SDS (PAGE) de extractos proteicos de <i>U. tomentosa</i> . A) Gel con el programa de isoelectroenfoque con voltaje lineal de 5.3 horas; B) Gel con el programa de isoelectroenfoque escalonado de 10 horas.	80
Figura 41. Geles en 2D (SDS-PAGE) de extractos de proteínas de raíces de <i>U. tomentosa</i> . A) Tinción con Imperial TM Protein Stain (Coomassie); B) Tinción con SYPRO Ruby (fluorescente).	82
Figura 42. Identificación de manchas proteicas (spots) de un gel 2D (SDS-PAGE) de proteínas de <i>U. tomentosa</i> , analizadas con el software Melanie 7. Para validar las manchas de proteínas se utilizó la herramienta 3D (derecha).	83
Figura 43. Imagen de la comparación de dos geles en 2D (SDS-PAGE) de raíces sin tratamiento de <i>U. tomentosa</i> , analizadas con el software Melanie 7. Se observa las proteínas utilizadas como referencia para alinear los geles.	83
Figura 44. Gel en 2D (SDS-PAGE) de proteínas de <i>U. tomentosa</i> , A) Control; B) después del tratamiento con BSO-JA. Las manchas de proteínas que se incrementaron al doble se indican el control(i), las nuevas proteínas se indican en el elicitado (n); con círculos rojos se indican las proteínas que se enviaron a secuenciar.	84

Índice de tablas

Tabla 1. Características de la estrictosidina glucosidasa procedente de diferentes especies vegetales*	12
Tabla 2. Sustratos triptamínicos probados en la reacción enzimática de STR de <i>U. tomentosa</i> .	49
Tabla 3. Purificación de la estrictosidina β -glucosidasa de cultivos de células elicidadas de <i>U. tomentosa</i> en biorreactor.	53
Tabla 4. Valores de K_m y V_{max} utilizando como sustrato estrictosidina de la SGD de <i>U. tomentosa</i> .	59
Tabla 5. Características de la estrictosidina β -glucosidasa de <i>U. tomentosa</i> .	64
Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen de SGD de raíces de _____	65
Tabla 7. Secuencia de la <i>Ut_PSGD</i> de <i>U. tomentosa</i> . Fragmento obtenido de 922 pb, en gris se indican los cebadores utilizados.	67
Tabla 8. Actividades enzimáticas de la SGD en diferentes extractos de proteína y expresión del RNAm <i>Ut_PSGD</i> en <i>U. tomentosa</i> .	77
Tabla 9. Número de manchas protéicas detectadas que coinciden en geles en 2D de <i>U. tomentosa</i> de raíces elicidadas con BSO-JA y raíces control.	85
Tabla 10. Proteínas identificadas de geles en 2D de <i>Uncaria tomentosa</i> *.	87

Abreviaturas

AIT	<i>Alcaloides indolterpénicos</i>
AOM	<i>Alcaloides oxindólicos monoterpénicos</i>
APX	<i>Ascorbato peroxidasa</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTP	<i>Basic Local Alignment Search Tool of Protein</i>
BSA	<i>Albumina de suero de bovino</i>
BSO	<i>Butionina sulfoximina</i>
CAT	<i>Catalasa</i>
cDNA	<i>Ácido desoxirribonucleico complementario</i>
CLUSTALW	<i>Programa de computadora ampliamente utilizado para realizar alineamientos múltiples de secuencias.</i>
CPR	<i>Citocromo P450 reductasa</i>
DEPC	<i>Dietilpírocarbonato</i>
DHC	<i>3-α-Dihidrocadambina</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
DTT	<i>Ditiotreitol</i>
DXP	<i>1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato</i>
EDTA	<i>Ácido etilendiaminotetraacético</i>
ERO's	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
EXPASY	<i>Sistema Experto de Análisis de Proteínas</i>
FPLC	<i>Cromatografía de proteínas</i>
γ -GCS	<i>γ-glutamilcistein sintasa</i>
GSH	<i>Glutación</i>
GR	<i>Glutación reductasa</i>
GSP	<i>Cebadores específicos</i>
GSSG	<i>Glutación oxidado</i>
HPLC	<i>Cromatografía líquida de alta resolución</i>
HPTLC	<i>Cromatografía en placa de alta resolución</i>
IAA	<i>Ácido indol acético</i>
IEF	<i>Isoelectro enfoque</i>
IPG	<i>Gradiente inmovilizado de pH</i>
IPP	<i>Isopentenil difosfato</i>
JA	<i>Ácido jasmónico</i>
KDa	<i>Kilo Dalton</i>
K_M	<i>Constante de Michaelis-Menten</i>
LC/ESI-MS	<i>Cromatografía líquida acoplada a masas, ionización por electroespray</i>
LC-MS	<i>Cromatografía líquida acoplada a masas</i>
MeJA	<i>Metal jasmonato</i>
MS	<i>Medio de cultivo Murashige y Skoog</i>
NADPH	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORCA	<i>Factor de transcripción de Catharanthus que responde a octadecanoico en el dominio AP2</i>
ORF	<i>Marco abierto de lectura</i>
pb	<i>Pares de base</i>
PCR	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
pI	<i>Punto isoeléctrico</i>
pKat	<i>Pico Katal</i>
PS	<i>Peso seco</i>
PVPP	<i>Polivinilpolipirrolidona</i>
TCA	<i>Ácido tricloro acético</i>
TDC	<i>Triptófano descarboxilasa</i>

RACE	<i>Rápida amplificación de cDNA por extremos terminales</i>
RNA	<i>Ácido ribonucleico</i>
RNA _m	<i>Ácido ribonucleico maduro</i>
RT-PCR	<i>Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa</i>
SDS	<i>Dodecilsulfato sódico</i>
SDS-PAGE	<i>Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (condiciones desnaturalizantes)</i>
SGD	<i>Estrictosidina β-glucosidasa</i>
SOD	<i>Superóxido dismutasa</i>
STR	<i>Estrictosidina sintasa</i>
U _t _PSGD	<i>cDNA completo clonado de la estrictosidina β-glucosidasa de U. tomentosa</i>
V _{max}	<i>Velocidad máxima</i>
ZCT	<i>Proteínas dedos de zinc</i>

Resumen

En este trabajo se estudiaron las características de la estroctosidina β -glucosidasa y su papel en la biosíntesis de los alcaloides oxindólicos monoterpénicos en cultivos de *Uncaria tomentosa*. Con el objetivo de entender el mecanismo de regulación a nivel de la estroctosidina se evaluó la actividad y la expresión génica de las enzimas relacionadas con la producción e hidrólisis de la de ésta, en cultivos de raíces de *Uncaria tomentosa* bajo condiciones de estrés oxidativo. Para propiciar el estrés oxidativo los cultivos se elicitaron con dos tratamientos sea con la adición de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una concentración de 0.2 mM ó con el de una combinación de sulfoximina butionina-ácido jasmónico (BSO-JA) a una concentración de 0.8 mM y 0.2 mM, respectivamente. Como resultado de la elicitación la actividad de las enzimas antioxidantes se incrementó; la actividad de las peroxidases con ambos tratamientos alcanzó un máximo de 2 veces en el día ocho con respecto a cultivos sin tratar (control). La glutatión reductasa (GR) incrementó su actividad en 1.4 veces con el tratamiento de H_2O_2 al día cinco, sin embargo en el tratamiento con BSO-JA la actividad de esta enzima disminuyó. La producción de alcaloides oxindólicos monoterpénicos (MOA) y la de los alcaloides glucoindólicos, 3 α -dihidrocadambina (DHC) y dolicantósido, fueron estimuladas después de la elicitación con H_2O_2 , alcanzando niveles de 886.4 ± 23.6 , 847.7 ± 25.4 y 87.5 ± 7.2 mg/g PS, en el día 8, que fueron 1.7, 2.1 y 2,3 veces mayor con relación al control. El tratamiento con BSO-JA provocó un incremento en los alcaloides 2 veces aun mayor comparado con el tratamiento con H_2O_2 y mostró un patrón bifásico con máximos a 0.5 y 8 días después de la adición. La producción de alcaloides fue precedida por un aumento en la actividad enzimática de estroctosidina sintasa (STR) y estroctosidina β -glucosidasa (SGD). Al elicitar con H_2O_2 ó BSO-JA, la actividad de STR (proteína pkat/mg) se incrementó 1.9 veces (93.8 ± 17.8 a las 24 h) o 2.5 veces (102.4 ± 2.2 a las 6 h) y la actividad de SGD (pkat/mg de proteína) en 2.8 veces (245.2 ± 14.4 a las 6 h) ó 4.2 veces (421.2 ± 1.8 a las 18 h) con relación al control. Se realizó el análisis de transcritos de ambas enzimas con los dos tratamientos, el cual mostró que hubo una inducción de la expresión de ambos genes. En el tratamiento con H_2O_2 los niveles de transcritos de la STR incrementaron a las 48-192 h y los de la SGD a las

24-48 h, mientras que en el tratamiento con BSO-JA los niveles de expresión de la *STR* aumentaron a las 12 h y de los de la *SGD* a las 24 h. Además, mediante LC/ESI-MS se confirmó la biosíntesis de dolisantósido por extractos protéicos de *U. tomentosa*, utilizando como sustrato N- ω -metiltriptamina y secologanina.

La *SGD* de *U. tomentosa* fue purificada de cultivos de células en suspensión, esta enzima presenta una masa molecular teórica aproximada de 60 KDa, un pH óptimo de 6.3 en presencia del amortiguador de fosfatos, un pI teórico de 5.76, una K_m de 1.096 mM, una V_{max} de 42.75 nmol.min⁻¹mg⁻¹, y como producto de formación la catenamina. La secuencia de la enzima purificada tiene una identidad del 60% en una región conservada que presentan otras estrictosidina glucosidasas reportadas. Dentro de los experimentos se obtuvo por clonación el cDNA completo de la *Ut_PSGD*, el cual se encuentra en las bases de datos con el n° de acceso JQ3666085. La secuencia contiene un marco abierto de lectura de 1662 pb, que codifica para 533 residuos de aminoácidos, con una masa molecular teórica de 63.32 KDa.

Con el objetivo de encontrar alguna de las diferentes enzimas que participan tanto la biosíntesis como en la regulación de los AOM, se analizó el perfil proteómico diferencial de raíces de *U. tomentosa* control y bajo condiciones de elicitación con BSO-JA. El perfil proteómico mostró 320 \pm 32 proteínas, de las cuales se seleccionaron nueve proteínas, que se llevaron a secuenciar. A partir del análisis de la secuencia de estas proteínas se identificaron dos isoformas de la estrictosidina sintasa, dos isoformas de triosa fosfato isomerasa, la ascorbato peroxidasa, la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa, una identificada como la subunidad alfa del proteosoma y una identificada como proteína de unión a RNA rica en glicina. Las condiciones de estrés oxidativo nos permitieron estudiar parte de la regulación de la biosíntesis de los AOM al nivel del metabolismo de la estrictosidina, la cual puede ser afectada por síntesis *de novo*, activación enzimática o flujo metabólico en los organelos celulares donde se producen o almacenan los metabolitos secundarios.

Abstract

In this work the characteristic of strictosidine β -glucosidase and its role in the biosynthesis of monoterpenoid oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* cultures were study. In order to investigate the regulation mechanism at the level of the strictosidine metabolism the activity and gene expression of strictosidine-related enzymes in *Uncaria tomentosa* root cultures exposed to oxidative stress were studied. Elicitation with 0.2 mM hydrogen peroxide (H_2O_2) or a combination of 0.8 mM buthionine sulfoximine and 0.2 mM jasmonic acid (BSO-JA) increased peroxidase activities by 2-fold at day 8 and glutathione reductase by 1.4-fold at day 5 in H_2O_2 elicited cultures respect to the control. Production of monoterpenoid oxindole alkaloids (MOA), 3 α -dihydrocadambine, and dolichantoside was stimulated after H_2O_2 elicitation, reaching levels of 886.4 ± 23.6 , 847.7 ± 25.4 , and 87.5 ± 7.2 $\mu\text{g/g DW}$, at day 8 which were 1.7-, 2.1- and 2.3-fold higher relative to control. BSO-JA elicited cultures produced twice alkaloids than H_2O_2 treated cultures, following a biphasic pattern with maxima at 0.5 and 8 days. Alkaloid production was preceded by increase in strictosidine synthase (STR) and strictosidine glucosidase (SGD) activities. After elicitation with H_2O_2 or BSO-JA, the STR activity (pKat/mg protein) increased by 1.9-fold (93.8 ± 17.8 at 24 h) or 2.5-fold (102.4 ± 2.2 at 6 h). On the other hand, the SGD activity increased (pKat/mg protein) by 2.8-fold (245.2 ± 14.4 at 6 h) or 4.2-fold (421.2 ± 1.8 at 18 h) relative to control. STR and SGD transcripts were upregulated after elicitation. H_2O_2 treated roots showed higher levels of STR at 48-192 h and SGD at 24-48 h, while BSO-JA treatments showed STR increased at 12 h and SGD at 24 h. Also, LC/ESI-MS confirmed the biosynthesis of dolichantoside from N- ω -methyltryptamine and secologanin by *U. tomentosa* protein extracts.

The SGD from *U. tomentosa* root cultures was purified and characterized. The molecular mass of the enzyme was estimated to be 60 kDa, it showed pH optima of 6.3 in phosphate buffer and a theoretical pI of 5.76. The values of the kinetics parameters were K_m 1.096 mM and V_{max} de $42.75 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. The main product of the strictosidine conversion by SGD was cathenamine. The internal amino acid sequences of the enzyme showed a 60 % identity with others SGD reported. The

cDNA clone encoding SGD was cloned through reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and denoted as *Ut_PSGD*, (JQ3666085). The clone is a full-length cDNA, which contains an open reading frame of 1662. The deduced amino acid sequence has 533 residues with a predicted molecular mass of 63.32 kDa

A proteomic approach was undertaken aiming at the identification of novel proteins involved in the alkaloid biosynthesis of *U. tomentosa*. A differential analysis of the proteomes from BSO-JA elicited and non-elicited roots cultures was performed. The root proteome under stress conditions showed 320 ± 32 protein spots. Nine of these protein spots were selected for identification by mass spectrometry. Proteomic analysis showing that the elicitor treatment up regulated the expression of strictosidine synthase (STR), triosephosphate isomerase, protease subunit alpha type, cytosolic ascorbate peroxidase, ribulose 1,5-biphosphate carboxylase oxygenase, proteasome subunit alpha type and a putative glycine-rich RNA binding protein. Oxidative stress conditions allowed us to study the regulation of MOA biosynthesis at level of strictosidine metabolism. Therefore, this production would be affected by synthesis *de novo*, enzymatic activation or metabolic flux in the cellular organelles that produce or store secondary metabolites.

1. Introducción

El uso de remedios de origen vegetal se remonta a la época prehistórica, presente en todas las culturas conocidas y es una de las formas más extendidas de medicina. La industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales para la síntesis y elaboración de fármacos, el proceso de verificación científica de estas tradiciones continúa hoy en día, descubriéndose constantemente nuevas aplicaciones. En la época contemporánea, cerca de la cuarta parte de los productos farmacéuticos recetados en los países industrializados contienen compuestos derivados de plantas. Entre los fármacos basados en plantas más conocidos se incluyen esteroides de digitoxina, morfina, codeína y quinina. Hasta ahora no ha sido posible producir sustitutos sintéticos que sean tan eficaces y específicos en términos farmacéuticos (Ortholand y Ganesan, 2004).

Las plantas producen una amplia variedad de metabolitos secundarios, éstos cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en su metabolismo primario. En el metabolismo primario de las plantas se llevan a cabo procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción. Como la fotosíntesis, el transporte de solutos, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrientes, la diferenciación de tejidos, y en general la formación de biomoléculas, que intervienen en estos procesos o son parte estructural de ellos.

Por otra parte, las plantas producen una diversidad de sustancias, producto del metabolismo secundario, algunas responsables de la coloración y aromas de flores y frutos, otras vinculadas con interacciones ecológicas, como es el caso de la atracción de polinizadores (Verpoorte, 2000). Actualmente, se ha demostrado que la mayoría de estos compuestos participan en mecanismos de defensa de las plantas. La razón de ser de estos metabolitos, llamados también fitoquímicos, permite una gama de usos en la agricultura y en la medicina. Adicionalmente, las múltiples funciones que presentan en las plantas permite la búsqueda de nuevos agroquímicos naturales, como insecticidas, herbicidas, reguladores de crecimiento, etc. Por el potencial que

representan estos metabolitos, las investigaciones no sólo se han dirigido a la elucidación de estructuras químicas y evaluación de su diferencial actividad biológica mediante bioensayos, sino hacia la obtención por cultivo *in vitro*.

Los metabolitos secundarios de las plantas de manera general pueden ser divididos con base en sus orígenes biosintéticos como: terpenoides, compuestos fenólicos como los fenilpropanoides, alcaloides y saponinas. Estos metabolitos se producen en cantidades pequeñas durante periodos muy largos; su síntesis química es extremadamente difícil y costosa. Sin embargo, la biosíntesis de estos compuestos es un proceso complejo que no se encuentra completamente dilucidados y en la mayoría de las rutas de biosíntesis, se desconoce el mecanismo de regulación de su formación. Además, muchas de las plantas que producen estos compuestos tan valiosos resultan difíciles de cultivar. En la actualidad se llevan a cabo cada día descubrimientos científicos que confirman el enorme potencial curativo que posee el mundo vegetal y que están transformando la fitoterapia en una práctica muy distinta a la de nuestros antepasados (Newman *et al.*, 2003).

En América del Sur el género *Uncaria* es utilizada por los pueblos indígenas de la selva amazónica en formas muy similares y tienen una larga historia de uso. La llamada Uña de gato (*Uncaria tomentosa*) ha sido utilizada medicinalmente por los pueblos Aguaruna, Asháninka, Cashibo, Conibo, y las tribus Shipibo de Perú, por lo menos por 2000 años. La extracción comercial a gran escala de uña de gato en el Perú comenzó a fines de la década de los ochenta y continua hasta la actualidad, manteniendo una tendencia creciente. La uña de gato se aprovecha cortando el tallo en trozos largos a partir de la base y después arrancando toda la corteza que sea posible mediante cortes. Desafortunadamente, la creciente demanda de uña de gato ha ocasionado que los vendedores usualmente corten plantas jóvenes o demasiado cerca al suelo lo que impide que retoñen después, ocasionando en muchos casos la muerte de la planta. Como es de suponerse, esta tendencia de aprovechamiento intenso y no controlado ha ocasionado la reducción drástica de la abundancia de uña de gato en muchos lugares del Perú causando incluso su desaparición.

En años recientes, con las investigaciones realizadas por diversos grupos, han surgido nuevas formas de propagación de esta especie. Existe una preocupación acerca del impacto en el consumo de especies posiblemente amenazadas. Una alternativa que permita la supervivencia y la producción sustentable de las mismas es desarrollada en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN, en donde se han establecido cultivos “*in vitro*” de *U. tomentosa* para la obtención de los metabolitos de interés farmacológico (Ramos-Valdivia y Cerda García Rojas, 2007).

1.1 *Uncaria tomentosa*

La familia de las Rubiáceas (**Rubiaceae**) cuenta con cerca de 7000 especies, se hallan a diferentes tipos de altitud y hábitat variados generalmente en clima tropicales. Son árboles o arbustos, a veces trepadores o hierbas. Algunos miembros importantes de esta familia son el género *Coffea* (cuya semilla es el café) y *Cinchona* (contiene el alcaloide quinina, principio activo de la quina utilizada en la medicina por sus propiedades febrífugas contra la malaria).

El género *Uncaria* es una importante fuente de productos medicinales particularmente de alcaloides, es un miembro de la familia de las Rubiáceas, es un arbusto leñoso el cual tiene como característica espinas curvadas (*uncus* en latín). Este género comprende cerca de 35 especies, las cuales están ampliamente distribuidas en regiones tropicales, incluyendo el sureste de Asia, África y el sur de América.

La clasificación taxonómica de *Uncaria tomentosa*:

Clase: Dicotiledóneas

Familia: Rubiácea

Género: *Uncaria*

Especie: *Uncaria tomentosa* (Willd) DC

Nombre común: Uña de gato, paraguayo, garabato, garbato casha, samento, toroño, tambor huasca, uña huasca, uña de gavilan, saventaro.

Uncaria tomentosa (Willd) DC, considerada originaria de Perú, es denominada así desde 1830. El vocablo tomentosa proviene de la observación de finos vellos existentes en el envés de sus hojas. Comúnmente llamada uña de gato produce alcaloides indolterpénicos oxidados tal como la pteropodina, mitrafilina, rincofilina y sus isómeros. Estos alcaloides oxindólicos monoterpénicos (AOM) tienen actividad farmacológica inmunoestimulante, anti-VIH, anti-leucémica y antitumoral (Laus, 2004). Recientemente, se ha reportado que la mitrafilina puede ser un nuevo medicamento para el tratamiento tanto de sarcoma humano y cáncer de mama (García *et al.*, 2006). Mientras que la rincofilina e isorincofilina mostraron protección contra la isquemia cerebral así como actividad sedante (Zhou y Zhou, 2010).

1.1.1 Alcaloides en *Uncaria tomentosa*

Los alcaloides constituyen un grupo de metabolitos secundarios que se encuentran únicamente en el 20% de las especies de plantas, contienen nitrógeno en su estructura, a menudo formando parte de un anillo heterocíclico (De Luca y St Pierre, 2000). La primera definición de alcaloide fue propuesta por el farmacéutico W. Messner (1818) y se aplica comúnmente a compuestos de origen vegetal que tienen propiedades alcalinas y que, a dosis débiles, presentan propiedades farmacológicas. Poseen en su naturaleza básica un nitrógeno amínico, salvo escasas excepciones como la efedrina y la mezcalina, donde el nitrógeno no forma parte de un heterociclo, además algunos alcaloides son neutros.

Los alcaloides se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo a su origen biogénico: 1) alcaloides derivados de aminoácidos tales como ornitina/arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptófano, y del ácido antranílico y el ácido nicotínico; 2) alcaloides purínicos; 3) terpenos aminados y 4) alcaloides policetídicos. Entre los alcaloides derivados del triptófano se encuentran los alcaloides indólicos,

mismos que pueden ser agrupados en monoterpénicos o indolterpénicos (iridoides) por la presencia de un núcleo iridoide.

Estudios fitoquímicos en *U. tomentosa* han demostrado que tienen varios compuestos: triterpénicos como glucósidos del ácido quinóico, esteroides, taninos, procianidinas, flavonoides y al menos 17 alcaloides indólicos y oxindólicos, que pueden ser del tipo pentacíclicos o tetracíclicos monoterpénicos (Aquino *et al.*, 1997; Ganzera *et al.*, 2001; García *et al.*, 2006).

1.1.2 Antecedentes de cultivos *in vitro*

Debido a las actividades farmacológicas de los alcaloides oxindólicos monoterpénicos (AOM) y que su producción es limitada a ciertas especies de plantas, es necesario establecer una metodología para el estudio y producción de estos compuestos. En nuestro grupo de investigación se establecieron cultivos *in vitro* de células y raíces de *U. tomentosa* con el interés, de conocer los factores que estimulan la producción de los AOM (Trejo-Tapia *et al.*, 2005; Trejo-Tapia *et al.*, 2007; Marín-López, 2009; Huerta-Heredia *et al.*, 2009), así como los mecanismos de regulación de su biosíntesis (Santos-Mendoza, 2010).

Los cultivos de raíces producen especialmente mitrafilina, isomitrafilina, rincofilina e isorincofilina en concentraciones hasta 100 veces mayores que en las células. Además, las raíces también producen alcaloides indol monoterpénicos glucosidados, tales como la 3- α -dihidrocadambina (DHC) y el dollicantósido (Huerta-Heredia, 2010, Fig. 1). Los cuales no se habían reportado anteriormente en plantas de *U. tomentosa*.

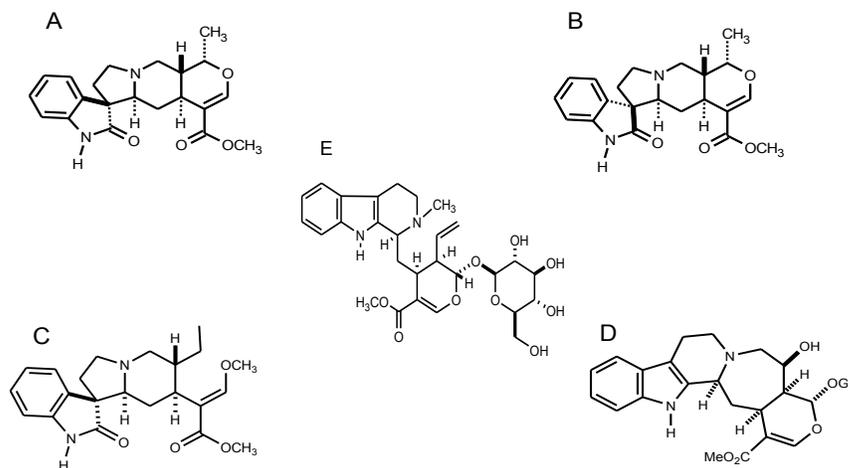


Figura 1. Alcaloides producidos por la raíz de *U. tomentosa* en cultivos *in vitro*. A) mitrafilina, B) isomitrafilina, C) isorincofilina, D) 3- α -dihidrocadambina y E) dollicantósido.

La DHC es un alcaloide glucoindólico con actividad hipotensora y antioxidante (Endo *et al.*, 1983, Kumar *et al.*, 2009) mientras que el dollicantósido es también un alcaloide glucoindólico al que se ha reportado actividad anti fúngica (Brandt *et al.*, 2001).

1.2 Biosíntesis de alcaloides indolterpénicos

Los alcaloides indolterpénicos comprenden cerca de 2000 compuestos naturales diferentes, con estructuras químicas complejas que presentan actividades biológicas específicas. La biosíntesis de estos metabolitos secundarios se relaciona con el metabolismo primario, ya que utiliza precursores del metabolismo primario provenientes de dos rutas metabólicas, tanto de la ruta del Shikimato en donde se lleva a cabo la biosíntesis de aminoácidos aromáticos; y de compuestos de la ruta de los isoprenoides (Zhao y Verpoorte, 2007).

El grupo indólico triptamina es formado a partir del triptófano reacción catalizada por la triptófano descarboxilasa (TDC; EC 4.1.1.28). En las plantas la parte terpénica (secologanina) es derivado del isopentenil difosfato (IPP), el cual proviene de la ruta del metileritritol fosfato a través de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) para la producción de alcaloides indólicos (Hong *et al.*, 2003). La condensación del indol,

conformado por triptamina y secologanina, conforma el primer alcaloide indólico glucosidado, la estrictosidina, reacción catalizada por la estrictosidina sintasa (STR; EC 4.3.3.2; Fig 2).

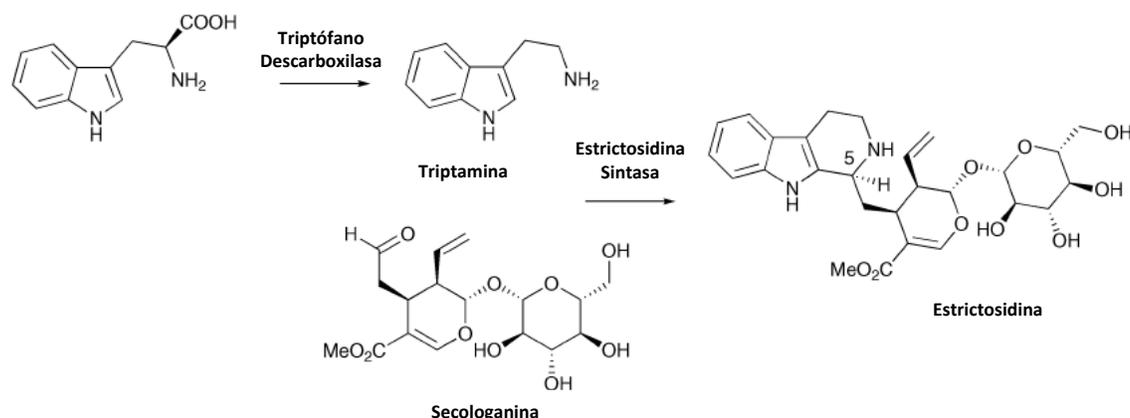


Figura 2. Primer paso en la formación de los alcaloides indolterpénicos.

La estrictosidina es el intermediario central en la biosíntesis de los alcaloides indólicos y quinoleicos, éste es convertido posteriormente por la estrictosidina β -glucosidasa (SGD, E.C. 3.2.1.105). El producto de reacción observado para diferentes especies de plantas es catenamina. Después de la conversión de la estrictosidina por la SGD, la ruta diverge produciendo cientos de diferentes productos finales. Esto depende del tipo de alcaloides que produzca la planta, como quinina (*Cinchona sp.*), ajmalicina (*Rauvolfia sellowii*), vallesamina (*Tabernaemontana divaricata*), vinblastina (*Catharanthus roseus*) entre otros (Fig. 3).

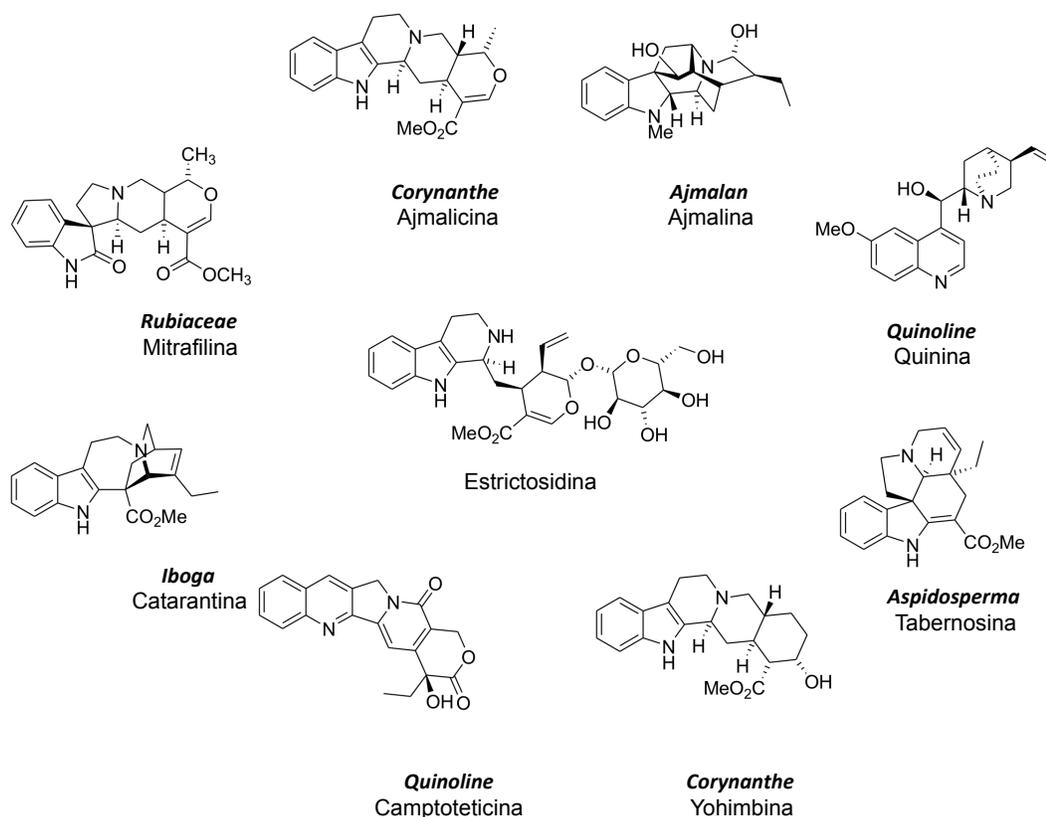


Figura 3. Tipos de alcaloides indolterpénicos derivados de la estrictosidina (Szabó, 2008b).

La biosíntesis de los alcaloides indolterpénicos (AIT) ha sido sujeta de muchas investigaciones, las primeras enzimas caracterizadas fueron la triptófano descarboxilasa (TDC) y la estrictosidina sintasa (STR) de *C. roseus* (Menke *et al.* 1999; van der Fits y Memelink, 2000), ya que estas enzimas son la unión del metabolismo primario con el secundario, por tal motivo diversos estudios han confirmado su papel regulatorio en la producción de AIT (Guirimand *et al.*, 2010a). Así mismo la participación en la regulación de la biosíntesis de los AIT de diversos compartimentos intracelulares (Guirimand *et al.*, 2010b; Geerlings *et al.*, 2000; Ziegler y Facchini, 2008).

La SGD es una enzima la cual ha sido estudiada a profundidad, purificada de cultivos celulares de *C. roseus*, *R. serpentina*, *R. sewelli*, de estos estudios se conoce sus características como peso molecular, isoformas, K_m , V_{max} , productos, el gen y se ha expresado en otros sistemas como *E. Coli* (Stevens *et al.* 1992;

Luijendijk *et al.*, 1998; Geerlings *et al.*, 2000; Guirimand *et al.*, 2010b). Cabe destacar que se ha encontrado que el producto de hidrólisis de la strictosidina por la SGD, tiene un efecto antimicrobiano, por lo cual esta enzima actúa como un mecanismo de defensa (Luijendijk *et al.*, 1996b), como la mayoría de las glucosidasas en la célula, en donde el sustrato es almacenado en un organelo (p.e. vacuola) y la enzima se encuentra fuera de ella, esperando una señal para hidrolizar el sustrato y convertirlo en un compuesto activo.

1.2.1 β -Glucosidasas de plantas

Las β -glucosidasas constituyen un grupo heterogéneo de enzimas, presentes tanto en organismos procariontes como eucariontes. En plantas las β -glucosidasas tienen un importante papel en diversos aspectos fisiológicos, por ejemplo en la formación de compuestos de defensa, activación de fitohormonas y en la degradación del endospermo durante la germinación (Vinther-Morant *et al.*, 2008). Las plantas a través de la evolución se han adaptado a su entorno para defenderse de microorganismos y patógenos mediante la biosíntesis de compuestos producto del metabolismo secundario. Estos compuestos de defensa se agrupan dentro los que se encuentran de forma constitutiva en la planta (fitoanticipinas) y aquellos que son sintetizados en respuesta del ataque de patógenos (fitoalexinas). Muchos de estos metabolitos secundarios están almacenados de forma no activa, con una glicosilación en su estructura química que le permite incrementar su estabilidad y solubilidad, para su adecuado almacenamiento en la vacuola y de esta forma proteger a la célula de los efectos tóxicos de su propio mecanismo de defensa (Jones y Vogt, 2001). Un estrés causado a la célula, por ejemplo es el ataque de un insecto, que va a provocar que los compuestos de defensa sean activados mediante la hidrólisis del enlace glucosídico, reacción generalmente catalizada por la β -glucosidasa. Estas enzimas pueden ser reguladas por compartimentalización, estando el sustrato y la enzima almacenados en diferentes compartimentos, se ha reportado que la biosíntesis de los alcaloides indolterpénicos en *C. roseus* se encuentra regulada mediante compartimentalización, al encontrarse sustratos y enzimas en diferentes organelos (Geerlings, 1999; Guirimand *et al.*, 2010b).

Las β -glucosidasas se encuentran en casi todos los organismos, estas tienen características muy similares, consisten generalmente de cuatro subunidades entre 55-65 kDa y tienen un pH óptimo ácido entre 5-6 (Esen, 1993). La secuencia de aminoácidos presenta alta homología entre plantas y otras de diferentes organismos como bacterias y hongos.

1.2.2 Estrictosidina β -D-glucosidasa

En la biosíntesis de metabolitos secundarios de plantas las glucosidasas tienen un papel regulatorio importante, debido a que generalmente catalizan una reacción limitante que comúnmente como se señaló anteriormente tiene al sustrato en un compartimiento subcelular diferente que el producto(s) de reacción. Además las glucosidasas tal como ocurre con la SGD, catalizan la transformación de compuestos con diferente papel fisiológico, es así que el compuesto glucosidado y la aglicona pueden tener diferentes efectos en la defensa a patógenos, la formación de estos compuestos se activa de manera diferencial dependiendo del tipo de elicitor utilizado; en el caso de los jasmonatos activan la biosíntesis de AIT mediante factores de transcripción específicos para la producción de estrictosidina a través de otras enzimas de la ruta de biosíntesis (Van der Fits y Memelink, 2000).

La estrictosidina β -D-glucosidasa (EC 3.2.1.105) es una enzima de plantas que se le ha considerado clave en la biosíntesis de cerca de 2000 alcaloides indolterpénicos, ya que al formarse el primer alcaloide glucoindólico, la estrictosidina, es necesario que esta sea desglicosidada para así dar origen a la formación de los diversos alcaloides indolterpénicos. En este importante paso biosintético es donde actúa la estrictosidina β -glucosidasa (SGD), la cual cataliza la reacción de hidrólisis de la estrictosidina dando como producto la aglicona de la estrictosidina y glucosa, siendo la aglicona un compuesto inestable, es convertido rápidamente en otro compuesto (Fig. 4). Los productos de hidrólisis formados en esta reacción han sido identificados principalmente como catenamina, isovallesiacotamina en *C. roseus* (Stevens *et al.*, 1992; Luijendijk *et al.*, 1998; Geerlings *et al.*, 2000), otros compuestos específicos

por ejemplo 4,21-dehidrogeissoschizina intermediario en la formación de los alcaloides aspidoesperma e iboga; el corinanteal intermediario en la biosíntesis cinchonidina; según el tipo de alcaloides que produce cada planta (Stöckigt y Panjikar, 2007; O'Connor y Maresh, 2006).

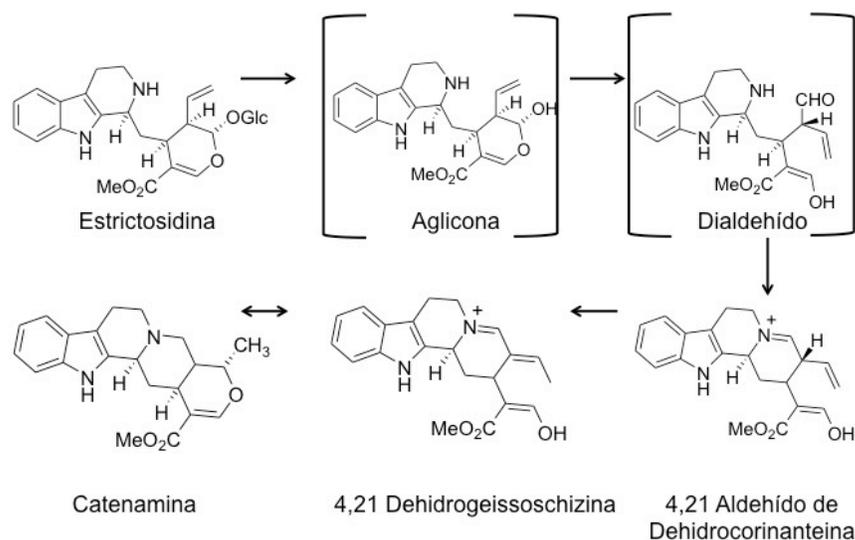


Figura 4. Intermediarios en la hidrólisis de la estrictosidina en *C. roseus* y en la biosíntesis de los alcaloides aspidoesperma e iboga.

La SGD ha sido purificada de células en suspensión de *Tabernaemontana divaricata*, *Catharanthus roseus*, *Rauvolfia sellowii*, *Rauvolfia serpentina* (Stevens *et al.* 1992; Luijendijk *et al.*, 1998; Geerlings *et al.*, 2000; Guirimand *et al.*, 2010b), en cultivos raíces pilosas de *Lonicera xylostem* y de *Cinchona robusta* (Stevens, 1994; Luijendijk *et al.*, 1996a) siendo la SGD de esta última, la única estudiada procedente de la familia de las Rubiáceas. Esta enzima ha sido sobre-expresada en *Rauvolfia serpentina* (Warzecha *et al.*, 2000) y en *Escherichia coli* de donde ha sido purificada (Barbelen *et al.*, 2005; Gerasimenko *et al.*, 2002). Dentro de las características de esta enzima se ha reportado que tiene una masa molecular aproximada de 60 KDa, es una proteína asociada a membrana como la mayoría de las β -glucosidasas y recientemente se le ha encontrado localizada cerca del núcleo (Guirimand *et al.*, 2010b). La tabla 1 muestra las características de la estrictosidina glucosidasa estudiadas en diferentes especies vegetales.

Tabla 1. Características de la estrictosidina glucosidasa procedente de diferentes especies vegetales*

	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Lonicera xylostem</i>	<i>Tabernaemontana divaricata</i>	<i>Rauvolfia sellowii/ Rauvolfia serpentine</i>	<i>Cinchona ledgeriana</i>	<i>Cinchona robusta</i>		
Tejido celular	Células en suspensión	Raíces pilosas	Células en suspensión	Células en suspensión	Células en suspensión	Raíces pilosas	Células en suspensión	
Ubicación	Proteína asociada a membrana							
Masa (KDa)	63 SDS-PAGE 930 650 240	930 669 440	670 190 22	> 70				
Inhibición	100 mM D (+) ácido glucónico- δ -lactona 1 mM Cu ²⁺ 1 mM serpentina		316 mM D (+) ácido glucónico- δ -lactona 1 mM serpentina	100 mM D (+) ácido glucónico- δ -lactona	100 mM D (+) ácido glucónico- δ -lactona 0.4 M glucosa			
Producto	Catenamina				No obvio	Catenamina		
Estabilidad	Disminuye al almacenarse a 80 °C			Inestable	Inactivación por precipitación y desalado			
Localización	Núcleo							
Gen	1875 pb			1599 pb				
Referencias	Stevens <i>et al.</i> (1992) Luijendijk <i>et al.</i> , (1998) Geerlings <i>et al.</i> , (2000) Guirimand <i>et al.</i> (2010b)	Hallard <i>et al.</i> , (1998)	Stevens, (1994) Luijendijk <i>et al.</i> , (1996a)	Geerlings <i>et al.</i> , (1999) Gerasimenko <i>et al.</i> , (2002)	Stevens, (1994) Luijendijk <i>et al.</i> , (1996)	Hallard <i>et al.</i> , (1998)		

*Tabla adaptada de Hallard, 1998.

Estudios previos demostraron que la SGD de *C. roseus* no es completamente diasteroselectiva ya que puede utilizar como sustrato análogos como la 5 α -carboxi-estrictosidina con un 90% de actividad; 18, 19-dihidro-estrictosidina con un 32.7% de actividad; dollicantósido con un 19.5% de actividad; N- β -acetil-estrictosidina con un 2.5% y el vincósido con un 94.6% siendo este último el compuesto con una reacción catalizada con alta eficiencia después de su sustrato original (Yerkes *et al.*, 2008; Gerasimenko *et al.*, 2002).

1.2.2.1 Mecanismo de reacción de la estrictosidina β -glucosidasa

La estrictosidina β -glucosidasa fue clasificada dentro de la familia 1 de las glicosil hidrolasas, por catalizar la hidrólisis del enlace glucosídico entre un carbono anomérico y el oxígeno del glucósido, por un mecanismo en el cual la configuración anomérica de la glucosa es retenida (Davies y Henrissat, 1995). Se conoce que estas enzimas conservan dos aminoácidos, el ácido glutámico (Glu, E) y el ácido aspártico (Asp, D) los cuales están involucrados con la actividad enzimática. El Glu actúa como nucleótido en la formación del intermediario enzima-glucosa y la Asp actúa como el catalizador ácido-base al protonar la glucosa y luego desprotonar el agua.

El análisis estructural de la SGD de *Rauvolfia serpentina* (Barleben *et al.*, 2007) demostró la participación de los residuos de aminoácidos reportados para glucosidasas. Sin embargo, se encontraron otros residuos los cuales tienen una función estructural importante Glu-207, Glu-416, His-161, siendo la Trp-388 la que le da especificidad con el sustrato. En la figura 5 se muestra la estructura en 3D obtenida de los datos de cristalización de la SGD de *R. serpentina*. En ella se muestra que la enzima está conformada por la estructura barril TIM identificada en la familia uno de las glicosil hidrolasas. Los barriles TIM son considerados plegamientos α/β , debido a que incluyen un modelo de alternancia de hélices alfa y láminas beta en un único dominio. La estructura de la SGD consiste en 13 α -hélice y 13 β -lamina, además el centro de la estructura contiene 8 láminas beta formando un barril soportadas por 8 α -hélices. En el barril se encuentra la cavidad en la cual el sustrato

se une con la enzima (Barleben *et al.*, 2007), que está formado principalmente por los dobleces irregulares entre las estructuras secundarias.

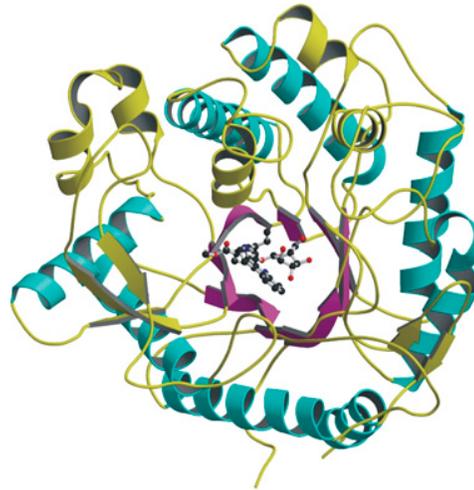


Figura 5. Estructura de la SGD de *Rauvolfia serpentina*. Adaptada de Barleben *et al.*, 2000.

1.2.3 Biosíntesis de AOM en *Uncaria tomentosa*

Estudios previos han demostrado que la formación de los alcaloides oxindólicos tetracíclicos o pentacíclicos son biosintetizados en los cultivos de *U. tomentosa* por oxidación de los alcaloides indólicos (Ramos Valdivia y Cerda García Rojas, 2007).

En cultivos de plántulas micropropagadas y de raíces en suspensión de *Uncaria tomentosa* se ha validado la biosíntesis de los AIT en esta especie, tanto a nivel de enzimas como con incorporación metabólica de precursores marcados radiactivamente. De estos resultados se ha confirmado que la ruta de biosíntesis hasta la formación de strictosidina es compartida con la ruta propuesta para las demás especies de plantas productoras de AIT (Ramos Valdivia y Cerda García Rojas, 2007; O'Connor y Maresh, 2006; Szabó, 2008a). Siendo la strictosidina el precursor de alcaloides indólicos; tal como la tetrahydroalstonina, isoajmalicina y akuamigina, mismos que rápidamente son transformados a oxindólicos en la parte aérea de las plántulas, mientras que los cultivos de raíces además de producir AOM

(rincofilina, isorincofilina, mitrafilina e isomitrafilina), también producen dos glucoindol alcaloides DHC y dollicantósido (Ramos Valdivia y Cerda García Rojas 2007; Luna-Palencia *et al.*, 2013).

En raíces de *Uncaria tomentosa* se ha reportado que además de los AOM se presenta la acumulación de dihidrocadambina (DHC), el cual es un alcaloide indólico glucosilado que ha sido identificado y caracterizado (Huerta-Heredia *et al.*, 2009, Luna-Palencia *et al.*, 2013) y que presenta actividad como hipotensor lo que hace su producción biotecnológicamente atractiva (Aisaka *et al.*, 1985). Como se puede observar en la figura 6 se podrá tener un mejor entendimiento de los factores que afectan la producción de los AOM si se incluye en su estudio aquellos factores que afectan la formación de DHC. Szabó (2008b) propuso que la iso-dihidrocadambina puede ser resultado de una reacción de oxidación de la estrictosidina vía su epoxidación. Sin embargo, otros autores han obtenido la síntesis de DHC, por epoxidación a nivel de la secologanina, para posteriormente unir este epóxido con la triptamina (Hamilton *et al.*, 1983; Saunders *et al.*, 1982). Así mismo, en las raíces se acumula la N- β -metil estrictosidina (dollicantósido), que ha sido aislado y caracterizado en la familia Loganiaceae. Cabe destacar que no se conoce completamente la biosíntesis de los glucoindol alcaloides DHC y dollicantósido producidos por esta planta, así como de las enzimas que estarían regulando su formación y cuyo estudio es necesario abordar para desarrollar estrategias para incrementar la producción de los AOM (Fig. 6).

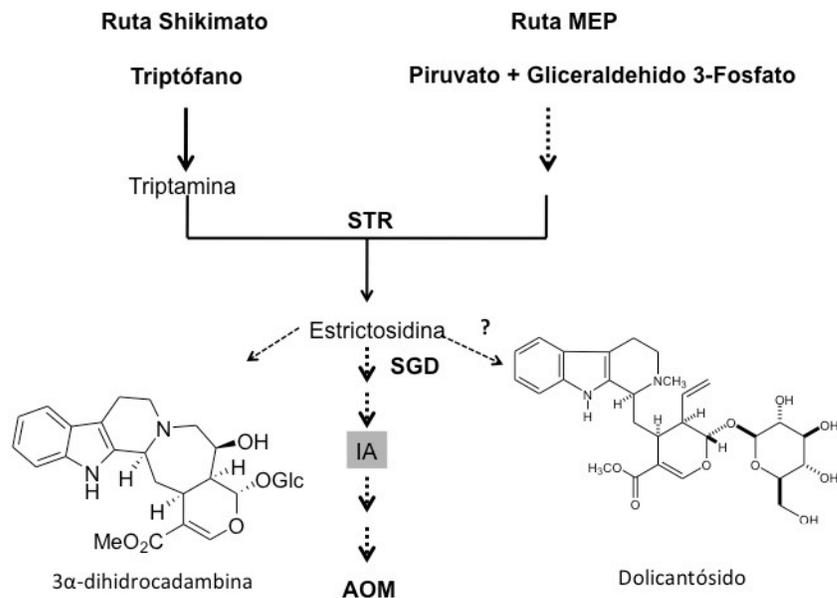


Figura 6. Biosíntesis de alcaloides indolterpénicos (AIT), 3 α -dihidrocadambina (DHC) y alcaloides oxindólicos (AOM) en cultivo de raíces de *U. tomentosa*. STR, estrictosidina sintasa; SGD, estrictosidina β -glucosidasa; MEP, ruta del mevalonato; AI, alcaloides indólicos; AOM, alcaloides oxindólicos monoterpénicos.

1.3 Elictores y señales de transcripción

Los elictores son generalmente definidos como moléculas que inducen o estimulan cualquier respuesta de defensa de las plantas, incluyendo la formación de fitoalexinas (Hahn, 1996). La aplicación de elictores a los cultivos de células vegetales no solo es útil para mejorar la productividad biotecnológica de metabolitos secundarios, sino también para estudiar las interacciones de la planta y el compuesto que induce los mecanismos de defensa. Los elictores interactúan con los receptores en las células huéspedes, que posteriormente favorecen el transporte de la señal primaria en la membrana plasmática, el citosol y/o el núcleo. La inducción de algunos genes de defensa requiere de la generación de alguna molécula señal secundaria endógena por parte de las células atacadas en el sitio de infección (Qin y Lanb, 2004). Los genes relacionados con la defensa conducen a un reforzamiento de las paredes de las células vegetales y se induce la acumulación de compuestos antimicrobianos tales como fitoalexinas, y la síntesis de proteínas que hidrolizan o inhiben la actividad microbiana (Zhao y Verpoorte, 2007).

Se ha comprobado que la acumulación de alcaloides indolterpénicos puede ser inducida por acción de los jasmonatos, compuestos producidos por las plantas en respuesta al estrés (Van der Fits y Memelink, 2000, Memelink *et al.*, 2001). Uno de los elicitores más utilizados es el ácido jasmónico (JA) y su metil-éster, el metil jasmonato (MeJA), los cuales son moléculas involucradas en transducción de señales como respuesta al ataque de patógenos. Los jasmonatos son compuestos derivados de los ácidos grasos que son sintetizados en la ruta del octadecanoico. Estas moléculas están relacionadas con algunos cambios fisiológicos en las plantas al promover senescencia y la disminución del crecimiento (Wasternack, 2007). La aplicación exógena de jasmonatos resulta en inducción de genes involucrados en la acumulación de metabolitos secundarios como alcaloides, glucosinolatos, terpenoides, antraquinonas (Memelink *et al.*, 2001). La adición de JA a cultivo de raíces de *C. roseus* incrementó la producción de varios compuestos pertenecientes a la ruta de biosíntesis de AIT (Rijhwani y Shanks, 1998).

La percepción de los elicitores dispara varias rutas de señalización, usualmente iniciando con un flujo de entrada de calcio ó un flujo de iones a través de las membranas que a su vez producirán especies reactivas de oxígeno (ERO's), fosforilación y desfosforilación de proteínas, generación de ácido jasmónico, expresión de factores de transcripción, flujo de precursores, producción de etileno, seguido por la síntesis de moléculas señal tales como el ácido salicílico y etileno, Fig. 7 (Menke *et al.*, 1999; Memelink *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2005; Radman *et al.*, 2003).

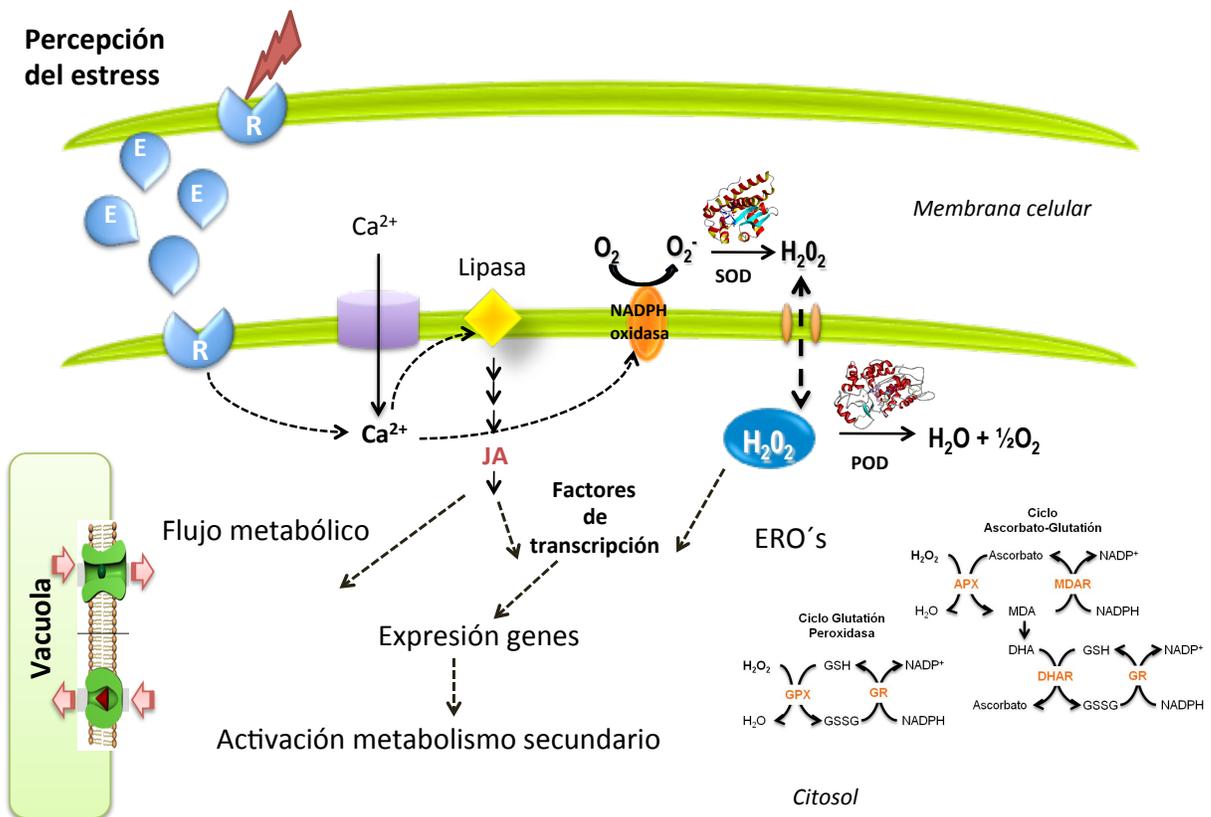


Figura 7. Percepción del estrés biótico o abiótico. Se encuentran implicados eventos como el estallamiento oxidativo. Éstos estimulan el flujo de Ca²⁺, dentro del citoplasma, el cual activa NADPH oxidasas, por activación de NAD quinasa; así mismo activa peroxidasas de la pared celular y otras enzimas relacionadas. El H₂O₂ puede tener diferentes destinos entre los más importantes: 1) La activación de señales de transducción; sea mediante su transporte a través de la membrana actuando directamente como una molécula señal o regenerando moléculas oxidadas tal como la ascorbato. 2) El flujo de H₂O₂ estaría además induciendo la expresión de genes específicos y activar la producción de metabolitos secundarios; 3) Los niveles de H₂O₂ están determinados tanto por su producción como su metabolismo, vía catalasa o su participación en el ciclo glutatión-ascorbato. Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APx), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), monodehidroascorbato reductasa (MDAR), radical superóxido (O₂⁻), monodehidroascorbato (MDA), dehidroascorbato (DHA), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), nucleótidos de adenina reducidos (NADPH), nucleótidos de adenina oxidados (NADP⁺).

Una estrategia para que se activen gran parte de los genes de la ruta de biosíntesis de alcaloides indólicos, en los que están involucrados hasta 20 pasos enzimáticos, es el uso de elicitores del tipo biótico o abiótico que activan a su vez los factores de transcripción. Estos factores de transcripción estimulan la producción de alcaloides indolterpénicos vía la inducción coordinada de genes en respuesta, como en el caso de la elicitación con los jasmonatos, que en *C. roseus* corresponden a

genes involucrados tanto a la rama indólica, terpénica y pos-estrictosidina de la ruta de biosíntesis (Memelink *et al.*, 2001).

Se ha observado que la ruta de los AIT es altamente regulada por la planta, es así que en los años recientes se han descubierto reguladores de la ruta entre los que se encuentran ORCA (Octadecanoid-derivative Responsive *Catharanthus* AP2-domain) ORCA2 y ORCA3, los cuales son factores de transcripción de respuesta a jasmonatos que pueden estimular la ruta de los AIT mediante activación selectiva de genes. En cultivos de suspensión de *C. roseus* la expresión constitutiva de ORCA3 incrementó el nivel de transcritos (mRNA) de varias de las enzimas de la ruta de biosíntesis de AIT tal como la triptófano descarboxilasa (*TDC*), 1-deoxi-D-xilulosa sintasa (*DXS*), citocromo P450 reductasa (*CPR*), estrictosidina sintasa (*STR*), estrictosidina β -glucosidasa (*SGD*) (van der Fits y Memelink, 2000). Por otro lado se han reportado reguladores negativos en la ruta de los AIT, como los son las proteínas de unión al DNA, conocidas como dedos de zinc (zinc finger-binding), las cuales son del tipo IIIA ZCT1, ZCT2 y ZCT3. Pauw y colaboradores, (2004) reportaron además secuencias de unión de las ZCT en los genes de *STR* y *SGD* en *C. roseus*. El análisis de las secuencias de *STR* y *TDC*, mostró también promotores G-box, los cuales permiten la unión de factores de transcripción llamados CrGBF, que reprimen la expresión de ambos genes (Sibéril *et al.*, 2001). Trabajos recientes han reportado otras regiones en diferentes genes (*STR* y *TDC*) de la ruta de biosíntesis de los AIT, que estarían sirviendo como amplificadores de la transcripción, lo que nos da una idea de lo complejo que es la regulación en la biosíntesis de los AIT (Suttipanta *et al.*, 2011).

En cultivo de células y de raíces de *Uncaria tomentosa* al utilizar ácido jasmónico (100-200 μ M) como elicitador, estimuló la producción de alcaloides indolterpénicos (Luna-Palencia *et al.*, 2007; Marín, 2009; Huerta-Heredia, 2010) y estos a su vez se les ha relacionado con un incremento en los transcritos de *STR* (Santos-Mendoza, 2010).

1.4 Estrés oxidativo

Se ha observado que el incremento de metabolitos secundarios como respuesta al estallamiento oxidativo provocado por estrés biótico o abiótico, en el cual hay un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ERO's), las cuales son formas reducidas del oxígeno atmosférico, como el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($OH\bullet$) que van a ser convertidos a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas especies se producen de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular, sin embargo un exceso en la producción de ERO's puede causar muerte celular (Quan *et al.*, 2008). Las plantas poseen un sistema que actúa conjuntamente para eliminar las ERO's, el cual puede ser enzimático o no enzimático, dentro del enzimático se encuentran: superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y peroxidasas; las moléculas antioxidantes que actúan a nivel celular son el ácido ascórbico y glutatión (ciclo glutatión-ascorbato). El glutatión es un antioxidante, que ayuda a proteger las células de ERO's y es un componente fundamental del ciclo glutatión-ascorbato que reduce el peróxido de hidrógeno, causado por estrés biótico o abiótico. En este ciclo la ascorbato peroxidasa (APX) utiliza al glutatión como donante de electrones para la regeneración del ascorbato, siendo estas dos moléculas los antioxidantes no enzimáticos más abundantes en la célula. La respuesta al estrés oxidativo es un proceso muy complejo en donde se activan muchos mecanismos de defensa para disminuir las ERO's.

En las plantas la generación de H_2O_2 se incrementa en respuesta a varios tipos de estrés, implicando a este compuesto como una señal de los fenómenos de aclimatación y tolerancia (Neill *et al.*, 2002). Este compuesto también puede ser generado por enzimas específicas de los sistemas enzimáticos xantina oxidasa, amino oxidasa, y peroxidasas de pared celular. Un estallamiento oxidativo con una rápida síntesis y liberación de H_2O_2 en el apoplasto es una respuesta común a patógenos, elicitores, daño, calor, luz ultravioleta y ozono.

El H_2O_2 actúa induciendo transcritos y activando la expresión genes que

codifican para proteínas y moléculas señal involucrados con mecanismos de defensa, crecimiento y desarrollo en la planta (Ślesak *et al.*, 2007). La aplicación exógena de H₂O₂ en plantas es usado para incrementar la producción de metabolitos secundarios, es así que la adición de 200 μM de H₂O₂ a plántulas de *C. roseus* incrementó la producción de vincristina y vinblastina (Tang *et al.*, 2009). En cultivos de *Uncaria tomentosa* la producción de AOM y DHC pueden ser incrementados por efecto del estrés oxidativo (Huerta-Heredia *et al.*, 2009; Trejo-Tapia *et al.*, 2007). Se sabe además que una de las respuesta que desencadena el tratamiento con jasmonatos es la producción de H₂O₂ (Hung *et al.*, 2005).

Como una estrategia para incrementar la producción de AOM y conocer más acerca de la regulación de los mismos, se utilizó en este trabajo un tratamiento con H₂O₂ y otro con una combinación de butionina sulfoximina (BSO) y ácido jasmónico (JA). El BSO un inhibidor específico de la γ-glutamil cisteína sintetasa, la cual es una enzima que participa en la biosíntesis del glutatión. Al ser el glutatión un componente fundamental del ciclo glutatión-ascorbato, un sistema que reduce el peróxido de hidrógeno, el BSO haría que el H₂O₂ se acumule en la célula desencadenando una cascada de señales para la activación de otros mecanismos de defensa, que puede resultar en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Por lo que la acción conjunta de estos elicitores provocaría que el sistema busque la forma de defenderse incrementando la producción de enzimas o metabolitos que ayuden a mantener el equilibrio redox.

2. Justificación

Los alcaloides oxindólicos monoterpénicos (AOM) tienen una gran importancia farmacológica debido a su actividad inmunoestimulante, antitumoral, antileucémica y anti-inflamatoria. Esto ha estimulado la comercialización de extractos, cápsulas y comprimidos de la planta *U. tomentosa*; por más de 40 compañías en Sudamérica y USA que los distribuyen a Europa y Asia.

Debido a la gran demanda de plantas *U. tomentosa* de más de 4 años provenientes del bosque natural (selva Amazónica de Perú) que en año, alcanzaron 700 ton/año, correspondientes a 14000 Ha; desde 1997 se ha tratado de controlar la recolección de la misma que detenga su sobre explotación. En el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería se investiga sobre estrategias biotecnológicas para incrementar los rendimientos de producción de alcaloides oxindólicos en cultivos “*in vitro*” de plántulas, raíces y células en suspensión de *U. tomentosa*, como una alternativa que permita la sustentabilidad de esta valiosa especie.

La producción biotecnológica de AOM en cultivos de *U. tomentosa* involucra el conocimiento de los pasos limitantes y regulatorios de su biosíntesis. Al no existir reportes de las características de la SGD, ni de su papel regulatorio en la producción de alcaloides oxindólicos en cultivos de *Uncaria tomentosa* su estudio permitirá un avance en el conocimiento de la regulación de la biosíntesis de alcaloides post estrictosidina.

3. Hipótesis

La biosíntesis de alcaloides indolterpénicos en *Uncaria tomentosa* estará regulada a nivel del metabolismo de la estrictosidina, siendo la estrictosidina glucosidasa la enzima post- estrictosidina que inicia su formación.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Estudiar las características de la estrictosidina β -glucosidasa y su papel en la biosíntesis de alcaloides indolterpénicos en *Uncaria tomentosa*.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar la actividad de la estrictosidina β -glucosidasa y estrictosidina sintasa bajo condiciones óptimas de producción de alcaloides indolterpénicos en los cultivos de raíz y plántula de *U. tomentosa*.
- Purificar y caracterizar la estrictosidina β -glucosidasa de raíces y células de *U. tomentosa*.
- Identificar los productos de reacción de las enzimas del metabolismo de la estrictosidina de *U. tomentosa*.
- Obtener el gen de la estrictosidina β -glucosidasa de *U. tomentosa*.

5. Materiales y Métodos

5.1 Material Vegetal

5.1.1 Medio y condiciones de cultivo para mantenimiento y crecimiento

Se utilizaron cultivos de plántulas, raíces y células en suspensión de *U. tomentosa*. Los cultivos se establecieron en el Laboratorio de Células Vegetales del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN, estos se obtuvieron de semillas germinadas *in vitro*. Las plántulas (UT-3) se mantienen en medio Rb (medio de enraizamiento, anexo 1), MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con 2 % de sacarosa (p/v), 0.5 mg/l de ácido indol acético (IAA) y 2 % de Gelrite (p/v). Los cultivos de raíz (UTr-3) se mantuvieron en medio líquido de MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con 2 % de sacarosa. Los cultivos de células (*green Uth-3*) se mantuvieron en el mismo medio de cultivo que las raíces adicionado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (10 μM) y cinetina (10 μM), la velocidad de agitación orbital de 100 rpm. Todos los cultivos se mantuvieron a una temperatura controlada de 25 ± 2 °C e iluminación continua (13 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

5.1.2 Elicitación de cultivo de raíces (UTr-3) con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o butionina sulfoximina-ácido jasmónico (BSO-JA) en matraz.

Se cultivaron raíces en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo, de la línea de raíces UTr-3, en medio MS suplementado con 3% de sacarosa (p/v) inoculados con 2 gramos de peso fresco (g PF). de raíces. Los matraces se incubaron a 25 °C, 110 rpm y con una iluminación de 13 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los cultivos de matraces se elicitaron a los 13 días después de su inoculación, con la adición de 0.2 mM H₂O₂ o una combinación de 0.8mM butionina sulfoximina-0.2 mM ácido jasmónico (BSO-JA). Se realizó una cinética de cultivos control y una de cultivos elicitados.

5.1.3 Cultivos celulares en biorreactor

Se utilizó la línea celular de *Uncaria tomentosa* (green Uth-3). La línea celular se mantuvo en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) complementado con sacarosa (2% p/v), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (10 μM), cinetina (10 μM), en un régimen de iluminación continua (13 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con temperatura controlada de 25 ± 2 °C y una velocidad de agitación orbital de 100 rpm. Los subcultivos para el mantenimiento de la línea celular se realizaron cada 14 días transfiriendo 5 gramos de células con base en el peso fresco (g PF) a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio MS con la composición previamente descrita. Para la purificación se utilizó un biorreactor tipo tanque agitado de 3L y uno de 7 L (Applikon, Schiedam, Holanda) a un volumen de operación de 1.4 L y 5 L respectivamente. La agitación de los cultivos fue con una turbina de cuatro paletas a 90° con una velocidad de agitación de 400 rpm, el flujo de aire de operación fue de 0.1 vvm para el reactor de 3L y 1 vvm para el de 7L. El tamaño de inóculo fue de 500 g células (10% p/v), crecidas en las condiciones mencionadas anteriormente. La adición de H_2O_2 se realizó al sexto día cuando las células se encontraban en la etapa de crecimiento según lo reportado por Marín-López (2009), la toma de muestra se realizó después de 24 h de la adición.

5.2 Extracción diferencial de alcaloides

El método de extracción de alcaloides se basa en el descrito por Luna-Palencia (2005). En este método la extracción se realiza a partir de biomasa congelada a -70 °C. La biomasa se pulverizó con ayuda de un mortero. De la biomasa pulverizada se extrajo los alcaloides, con ácido clorhídrico al 5% en una proporción 1:10, por gramo de biomasa fresca. Posteriormente la muestra se sonica por 15 min, se centrifuga a 2500 rpm y se filtra. El filtrado ácido se alcalinizó hasta pH 8-9 con hidróxido de amonio (NH_4OH) al 29%. Posteriormente se agregó cloroformo (CHCl_3) en una proporción de 1:2 (1 de cloroformo por 2 del filtrado alcalinizado). Los alcaloides se extrajeron de la fase orgánica con ayuda de un embudo de separación, se recuperaron los alcaloides de la fase orgánica, evaporando en un rotavapor a 60 °C. La extracción de alcaloides del medio de

cultivo, se inició con el ajuste de pH a 8-9 utilizando NH_4OH . Posteriormente se extrajeron los alcaloides con CHCl_3 en una proporción de 1:1. El cloroformo es evaporado y las muestras se analizaron por HPLC.

5.2.1 Cuantificación de alcaloides

Las muestras se disolvieron en una mezcla de amortiguador de fosfatos 100mM, pH7, y acetonitrilo, en una proporción 9:11. Posteriormente, las soluciones se filtraron a través de membranas de nylon de 0.25 mm. Las muestras se inyectaron en un sistema de HPLC (Cromatografía de Varian ProStar 333; Varian, Berkeley, CA) equipado con una columna C18 de fase inversa (Waters Spherisorb 5 mm ODS2 de 250 mm longitud de 4.6 mm de diámetro). La elución se llevó a cabo con una mezcla de 10 mM de amortiguador de fosfato y acetonitrilo (9:11) a una velocidad de flujo de $0.7 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, detección a 244 nm. Los alcaloides fueron identificados por comparación de las curvas de UV y tiempos de retención con las de los compuestos estándar. Para la cuantificación de AOM, se utilizó mitrafilina como el compuesto estándar para determinar la curva de calibración, mientras que para la cuantificación de los alcaloides glucosidados, se utilizó a la 3α -dihidrocadambina. Los tiempos de retención fueron: 9 min para 3α -dihidrocadambina, 11 min para dolichantoside, 12 min estrictosidina, 19 min para mitraphylline, 23 min para isomitraphylline, 30 min para isorincofilina, y 41 min para rincofilina.

5.2.2 Identificación de compuestos por cromatografía en placa de alta definición (HPTLC)

Para la identificación de los productos de la reacción enzimática (Catenamina, 5-6 dihidroflavoperirina) se realizaron placas de HPTLC, en donde se probaron los siguientes sistemas de solventes: I, CHCl_3 : EtOH (30:1), Rf 0.59; II, CHCl_3 : MeOH (4:1); Rf 0.42. Para 5-6 dihydroflavopereirina: III, n-butanol: ácido acético: H_2O (4:1:1), Rf 0.6. La estrictosidina se identificó en placas de HPTLC, en el siguiente sistema de solventes: IV, CHCl_3 : MeOH (4:1), Rf 0.36. De acuerdo a los sistemas de solventes utilizados por Stöckigt (1978) y Geerlings (1999).

5.3 Extracción de proteína

El tejido vegetal congelado con nitrógeno líquido se trituró en un mortero y se le adicionó 5 % (p/p) de polivinilpolipirrolidona. La mezcla homogenizada se transfirió a un tubo de centrifuga y añadió el amortiguador de extracción (0.1 M fosfato de sodio pH 6.3; 3mM EDTA; 6 mM DTT) en una proporción aproximada de 1:1 (Luijendijk *et al.*, 1998). La muestra se centrifugó a 14000 rpm por 10 min para eliminar restos celulares. Posteriormente las muestras fueron desaladas a través de columnas MicroBio Spin 30 (BioRad). La proteína total se cuantificó utilizando el método de Peterson (1977), utilizando albumina de suero de bovino (BSA) como estándar.

5.3.1 Extracción de proteína mediante precipitación ácida.

El tejido vegetal (10 g) congelado con nitrógeno líquido se trituró en un mortero. La mezcla se transfirió a un tubo de centrifuga y se añadió el doble en volumen de la solución de precipitación (acetona, 10% TCA, 0.07% β -mercaptoetanol) a -20 °C. Se mezcló con agitación y dejó reposar a -20 °C toda la noche. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 3000 rpm durante 15 min para separar los restos celulares. El sobrenadante libre de células, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min (4 °C) y se colectó el precipitado en un tubo eppendorf de 1.5 ml. La pastilla obtenida se lavó con 1 ml de acetona que contenía 0.07 % β -mercaptoetanol (-20 °C), se centrifugó a 14000 rpm por 5 min (4 °C). La acetona es decantada de la muestra y los residuos se dejan evaporar. La pastilla contiene la proteína. La proteína se hidrató con agua desionizada (10-20 μ l) y resuspendió en amortiguador de rehidratación BioRad (2% CHAPS, 1 % anfolinas, 8 M urea, 65 mM DTT). El amortiguador de rehidratación BioRad fue completado a 9.5 M de urea y 2 M de tiourea. Las muestras se desalaron en columnas Micro-Spin de BioRad. La cuantificación de proteína se realizó con 2D-Quant Kit (Amersham, USA).

5.4 Actividad de enzimas antioxidantes

5.4.1 Actividad enzimática de guayacol peroxidasa

La actividad de guayacol peroxidasa (POD) se cuantificó siguiendo la oxidación del guayacol por acción del H_2O_2 a 470 nm ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) de acuerdo a Pütter (1974). Se utilizaron 10 μl de extracto crudo proteico, los cuales se incubaron en una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, pH 6.0 en presencia de 3 mM de H_2O_2 . La reacción se inició con la adición de guayacol a una concentración final de 15 mM. La absorbancia fue leída a 470 nm con un espectrofotómetro DU 7500, Beckmann, Munich, después de 2 min de reacción. La actividad de POD es definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de guayacol por minuto.

5.4.1.1 Zimogramas de guayacol peroxidasa

Los zimogramas para las peroxidases se realizaron mediante una electroforesis vertical en condiciones nativas (PAGE). Cantidades iguales de proteína se utilizaron (20 μg) y se separaron en geles de poliacrilamida del 10 %. Las isoformas de las peroxidasa se visualizaron por la inmersión del gel en la misma mezcla de reacción utilizada para el ensayo de la actividad peroxidasa descrita anteriormente.

5.4.2 Actividad enzimática de glutatión reductasa

La actividad de la glutatión reductasa fue cuantificada mediante un kit (Sigma). Se determina la actividad por la disminución de la absorbancia causada por la oxidación del NADPH a 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.4.2.1 Zimogramas de glutatión reductasa

Los zimogramas para la actividad de la glutatión reductasa se llevaron a cabo de acuerdo a Manchenko (1994). Después de la electroforesis en condiciones nativas, los geles se lavaron con una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.3 M, pH 8;

cuidadosamente se sobrepuso un gel indicador. El gel indicador se preparó en 10 ml de una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.3M, pH 8, la cual contenía 7 mg de NADPH y 30 mg de disulfuro de glutatión. Por separado se preparó agarosa (2%) en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.3M por calentamiento. La solución que contenía el disulfuro de glutatión se añadió a la agarosa caliente (10 ml), se dejó solidificar durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente antes de sobreponer el gel indicador con el gel que contiene las muestras. La actividad de la glutatión reductasa es visible con luz ultravioleta 306 nm como unas bandas oscuras.

5.4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron al 10% en condiciones nativas y desnaturalizantes con base en la metodología de Laemmli (1970). Para los geles en condiciones nativas no se utilizó dodecilsulfato sódico (SDS).

5.5 Actividad de enzimas del metabolismo secundario

5.5.1 Actividad de estrictosidina sintasa (STR)

La actividad de la estrictosidina sintasa (STR) se midió utilizando una modificación del ensayo descrito previamente por Pennings *et al.* (1982). El extracto enzimático (50 μ l) se incubó en una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM de pH 6,8 que contenía 0.8 mM de triptamina, 2 mM secologanina y 100 mM de D (+) ácido glucónico- δ -lactona (preparado en 1M de amortiguador Tris sin ajustar el pH), el volumen de reacción fue de 200 μ l. La reacción se incubó durante 30 min a 35 ° C. La reacción se detuvo basificando a un pH de 8 aproximadamente con 25 μ l de una solución de NH₄OH (72 mM), posteriormente los compuestos son extraídos con acetato de etilo (3:1 v/v) dos veces. El acetato de etilo es evaporado y se analizan por el método de HPLC descrito anteriormente. Se cuantificó la formación de estrictosidina.

5.5.2 Producción de dollicantósido

Para investigar la capacidad de formación de dollicantósido en extractos enzimáticos de *U. tomentosa*, se obtuvo proteína de cultivos de raíces como se describió anteriormente. Este extracto fue precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el cual fue adicionado lentamente para obtener una concentración de la sal del 35%, la mezcla se agitó por 60 min a 4 °C. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 10000g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se saturó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para obtener una concentración final del 50%. La mezcla se agitó por 60 min, se centrifugó y el precipitado obtenido se disolvió en 0.1 M de amortiguador de potasio pH 6.8. Columnas PD-10 (GE Healthcare) se utilizaron para remover las sales de la muestra. Las reacciones enzimáticas se realizaron a partir de 50 μl del extracto enzimático semi-purificado utilizando *N*- ω -metiltriptamina en lugar de triptamina. También se utilizaron otros compuestos triptamínicos: 5-hidroxi-triptamina; 5-metoxi-triptamina, 5,6-dihidroxi-triptamina, 6-metoxi-triptamina. La preparación de la reacción enzimática y extracción del producto se realizaron como fue descrito anteriormente para la formación de estrictosidina. Los tiempos de retención fueron 11 min para el dollicantósido y 37 min para la *N*- ω -metiltriptamina. Los productos de reacción fueron analizados por LC/ESI-MS en el Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman WA, en un sistema cromatográfico de alta resolución acoplado un espectrómetro de masas ThermoElectron Surveyor con trampa de iones ThermoElectron LCQ Advantage y a un detector de ultravioleta-visible con arreglo de diodos. Para la separación se utilizó una columna Discovery HS C18 de tamaño de partícula 3 μm , y de dimensiones 150 \times 2.1 mm con guarda columna (Supelco, Bellefonte, PA, E.U.A.). Como fase móvil se utilizó formiato de amonio 5 mM y 0.1% ácido fórmico como amortiguador eluyente A y acetonitrilo como eluyente B. La elución se llevó a cabo con (1) 0–2 min, 5% B; (2) 2–27 min, 5–100% B; 27–30 min, 100% B; 30–35 min, 100–5% B; 35–45 min, 5% B con un flujo de 0.25 mL/min, la temperatura de la columna a 40 °C, el volumen de inyección fue de 10 μL . Los compuestos se monitorearon a 267 nm. Las condiciones óptimas para el ESI fueron: temperatura del capilar 275 °C, voltaje 4.00 V, flujo del gas en la membrana 48, flujo del gas acarreador 5, voltaje de la fuente 5.10 kV (modo positivo). Los tiempos de

retención fueron *N*- ω -metiltriptamina 8.78 min, dihidrodolicantósido 11.60 min, isodolicantósido 11.89 min, y dolicantósido 12.44 min.

5.6 Actividad de estrictosidina β -glucosidasa (SGD)

5.6.1 Cuantificación SGD por HPLC

La actividad enzimática para SGD se realizó mediante una modificación del método de Stevens *et al.* (1992) para su cuantificación por HPLC. Se realizó una solución de estrictosidina (0.1 mM en amortiguador de fosfatos pH 6.3), se añadieron 20 μ l de extracto crudo de proteína en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.3 con 1mM de estrictosidina, se incubó la mezcla de reacción a 30 °C por 1 h. La reacción se detuvo basificando a pH 8 con 25 μ l de una solución de NH₄OH (72 mM), posteriormente los compuestos son extraídos con acetato de etilo (3:1) dos veces. El acetato de etilo se evaporó y los compuestos producto de la hidrólisis de la estrictosidina se analizaron por el método de HPLC descrito anteriormente. Se cuantificó el consumo del sustrato, disminución de estrictosidina.

5.6.2 Cuantificación de la actividad de la SGD por glucosa liberada

La actividad de esta enzima se determinó también mediante la medición de la liberación de glucosa utilizando el kit Amplex Red® (Invitrogen), metodología utilizada por Yerkes y colaboradores (2008). La reacción enzimática se llevó a cabo como fue descrita anteriormente. Pasado el tiempo de incubación la reacción se terminó por la adición de NH₄OH (72 mM) ajustando el pH a 8.0 aproximadamente. Se utilizaron 10 μ l de la reacción para medir la glucosa liberada. Se cuantificó la concentración de glucosa liberada utilizando una curva patrón.

5.7 Análisis bidimensional de proteínas

La electroforesis bidimensional (O'Farrell, 1975) consta de una separación de las proteínas en una dimensión en base a su punto isoeléctrico (pI) por isoelectroenfoque (IEF) y en una segunda dimensión en base a su peso molecular

(PM) en electroforesis SDS-PAGE. Una vez determinada la concentración de proteína se procedió a tomar la cantidad de extracto adecuado para el análisis por electroforesis bidimensional. Para este análisis, los extractos protéicos se desalaron utilizando columnas MicroBio Spin 30 (BioRad), se realizó IEF, se equilibraron las tiras y se corrieron en geles SDS-PAGE para una segunda dimensión; como se describe a continuación.

5.7.1 Isoelectroenfoque

Las proteínas antes de ser separadas en la primera dimensión fueron pasadas a través de columnas Micro-BioSpin (BioRad, USA). Con el objetivo de eliminar la presencia de sustancias como sales, lípidos, ácidos fenólicos y nucleicos, los cuales pueden interferir con la separación en el isoelectroenfoque (IEF) y en la visualización de los ensayos bidimensionales. El IEF permitió separar las proteínas con base en su carga neta. Se utilizó el equipo PROTEAN IEF Cell (Biorad) y tiras de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 4-7, de 11 cm (BioRad, USA). Se colocó la muestra de proteína, a la que se limpió previamente (250 µg, en 200 µl) en cada sarcófago; enseguida se colocaron las tiras de gradiente inmovilizado de pH (IPG) en contacto con la muestra evitando la formación de burbujas para evitar una mala separación y posteriormente se adicionaron 2 mL de aceite mineral (Biorad, USA) para evitar la evaporación de la muestra y cristalización de la urea. Para el isoelectroenfoque de las proteínas se utilizó el método Running Preset (Biorad). Que consistió primero en una rehidratación pasiva por 16 h a una temperatura de -20°C. Inmediatamente, se realizó un paso de acondicionamiento de 250 V por 15 min Posteriormente, se incrementó el voltaje de manera lineal hasta un voltaje máximo de 4000 V, el cual se mantuvo hasta llegar a un voltaje total de 35 000 V. El voltaje no debe exceder 50 mA/tira. Todo el IEF se hizo a una temperatura de 20°C debido, a que a temperaturas mayores de 37°C pueden producir la carbamilación de las proteínas y además temperaturas menores a 10°C pueden ocasionar la cristalización de la urea. Las tiras IPG fueron inmediatamente congeladas y almacenadas individualmente a -20° C hasta su uso. El paso de primera a segunda dimensión involucra dos etapas la reducción y la alquilación de los grupos sulfhídricos. Las IPG

fueron equilibradas adicionando 1.5 ml de amortiguador de equilibrio I (6M urea, SDS 2%, amortiguador Tris/HCl 0.05M, pH 8.8, glicerol 20%, DTT 2%) durante 15 min en agitación, para reducir los grupos sulfhídricos. Posteriormente, se decantó y se adicionó el amortiguador de equilibrio II compuesto de urea 6M, SDS 2%, amortiguador Tris/HCl 0.05M, pH 8.8, glicerol 20%, iodoacetamida 2.5%) para alquilar los grupos sulfhídricos. Se agitaron las tiras durante 15 min y posteriormente se colocaron en el gel para analizar en una segunda dimensión.

5.7.2 Separación de proteínas en una segunda dimensión

Una vez equilibradas las tiras IPG, fueron colocadas en geles SDS-PAGE para una segunda dimensión, en los cuales las proteínas se separaron por su masa molecular de forma perpendicular a la primera dimensión. El análisis electroforético se realizó en una cámara vertical SE 600 Ruby™ (GE Healthcare Life Science), en geles del 12 % (SDS-PAGE) a temperatura ambiente. Se corrieron 45 min a 25 mA por gel y 2.5 horas a 35 mA por gel; en amortiguador de corrida 1X (25 mM Tris pH 8.8; 192 mM glicina; SDS 0.1%). Una vez finalizada la corrida, los geles fueron teñidos con Sypro Ruby (BioRad, USA) según las instrucciones del fabricante.

5.8 Purificación de la estrictosidina β -glucosidasa

Veinticuatro horas después de la adición de H₂O₂, las células del cultivo fueron cosechadas por filtración haciendo uso de un embudo Buchner y filtro de papel Whatman. Uno y medio kilogramo de células fueron congeladas y subsecuentemente homogenizadas en una licuadora por 1 min a velocidad alta. Al polvo congelado se le adicionó: 75 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 850 ml de 0.1 M amortiguador de fosfatos pH 6.3, el cual contenía 3mM EDTA y 6 mM DTT. Después de descongelar la muestra, manteniendo una temperatura de 5 °C, el homogenizado fue exprimido a través de Miracloth (Pellón lavado). El filtrado fue centrifugado por 40 min a 10 000 g a 4 °C.

Después de la centrifugación, se obtuvieron 850 ml de sobrenadante, el cual fue saturado al 15% de sulfato de amonio, se agitó por 30 min a 4 °C. Pasado el tiempo se centrifugó a 10 000 g por 20 min. El sobrenadante se llevó al 45 % de saturación con sulfato de amonio, se agitó por 30 min a 4 °C y se centrifugó de la misma manera. El precipitado se disolvió en 15 ml de amortiguador 100 mM Tris-HCl, pH 6.3; el cual contenía 3 mM EDTA y 6 mM DTT; éste fue desalado utilizando una columna PD-10 (GE, Healthcare). Se obtuvieron 50 ml después del desalado, estos fueron concentrados 5 veces, mediante ultrafiltración utilizando una membrana de corte de 30 KDa. Al termino de la paso anterior, se consiguieron 10 ml de extracto proteico, de los cuales se purificó la proteína utilizando un cromatógrafo para proteínas, ÄKTA FPLC (GE, Healthcare). La muestra se inyectó en alícuotas de 1 ml en una columna HiTrap Q FF 1 ml (GE, Healthcare), la elución se realizó con un gradiente NaCl (0 M a 1M en 50 mM amortiguador Tris-HCl, pH 6.3) en 20 min a 1 ml/min, el programa gradiente de NaCl se realizó en 5 volúmenes para subir de 0 a 400 mM, en 3 volúmenes para subir de 400 mM a 1 M. Para checar las fracciones que tenían actividad de SGD, las muestras se desalaron utilizando una columna PD-10. Las fracciones con actividad se concentraron utilizando unas columnas CENTRICON YM-30 (membrana de corte de 30 KDa) hasta obtener 2 ml de muestra. Estos 2 ml, se separaron por cromatografía utilizando el equipo, en la misma columna con los parámetros características mencionadas anteriormente. Previo a la detección de la actividad de SGD en las fracciones, a las muestras se les cambió al amortiguador por 100mM fosfatos, pH 6.3, y al mismo tiempo se desalaron utilizando una columna PD-10. Las fracciones con actividad se concentraron utilizando una columna CENTRICON YM-30 hasta obtener 500 µl de enzima purificada. Las concentraciones de proteína, se detectaron utilizando el método de Bradford (1976) utilizando una curva de albúmina de suero bovino.

5.9 Clonación del cDNA de la estrictosidina β -glucosidasa

5.9.1 Obtención RNA total hojas

Se utilizó el método con TRIZOL[®] (Chomczynski y Sacchi, 1987). Se congelaron 100 mg de tejido vegetal (hojas de plántulas) con nitrógeno líquido, los cuales se trituraron en un mortero, posteriormente se siguió el protocolo descrito por el proveedor. Se determinó calidad y cantidad de RNA obtenido mediante electroforesis, utilizando geles de agarosa al 1.5 % y teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes se adquirieron con el equipo KODAK image station 2000R y fueron analizadas con el KODAK Molecular imaging Software versión 4.0.

5.9.2 Obtención RNA total raíces

La extracción de RNA de raíces se llevó a cabo de acuerdo a Liao *et al.* (2004). A 300 mg de raíces se le adicionaron 5 ml de solución de extracción I (precalentada a 65 °C, (Anexo, SI), la muestra se llevó a un baño a 65 °C por 10 min. Posteriormente se le adicionaron 250 μ l de la solución II, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 12000g por 10 min a 10 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se extrajo con la solución II (Anexo, SII), se mezcló y centrifugó a 12000g por 10 min, este paso se repitió una vez más. Al sobrenadante obtenido se le adicionó 1.5 ml de solución III, se dejó reposar toda la noche a 4 °C. Pasada la incubación se centrifugó a 12000g por 30 min a 4 °C. La pastilla obtenida se disolvió en 0.5 % de SDS (500 μ l), se extrajo nuevamente con 1 ml de la solución II, se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El material se extrajo con 1 ml de etanol y se dejó reposar 2 h a 20 °C, después de la incubación la muestra se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70 %. El etanol se evaporó a 35 °C por 10 min. El RNA obtenido se disuelve en 30 μ l de H₂O. Al H₂O se le adicionó dietilpirocarbonato (DEPC), que es un inhibidor de RNAsas.

5.9.3 Amplificación de cDNA por extremos terminales (RACE)

Para obtener un primer fragmento del gen, se utilizaron cebadores degenerados provenientes de regiones conservadas de β -glucosidasa *C. roseus*, *R.*

serpentina y *Psychotria ipecacuana*, involucradas en la biosíntesis de alcaloides. El cebador directo F1: AACTCTCTTCCACTGGGATSTTCCCAA, el cebador reverso F2: TGTACCATATGGCTGAATCCTTTCGGTATCT. El RNA total fue convertido a cDNA mediante una RT-PCR, utilizando la enzima ThermoScrip™RT (Invitrogen); para sintetizar y amplificar en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). La síntesis del cDNA se llevó a cabo con 5 µl de RNA total incubándolo a 50 °C por 60 min, seguida por una etapa de inactivación a 85 °C por 5 min. El programa consistió de 30 ciclos de una etapa de desnaturalización a 94°C 40 s, seguida por una etapa de alineación a 50 °C, por 50 s y una etapa de elongación a 72°C por 1 min. Una extensión final de 10 min a 72 °C se agregó al final del programa. Se obtuvo un fragmento de 922 pb, el cual fue purificado y clonado en un vector pGEM-T Easy (Promega). El plásmido fue amplificado y purificado en células de *E. coli* JM109. Cuatro plásmidos provenientes de diferentes colonias, tanto el extremo 5'- y 3'- del vector conteniendo el fragmento clonado fueron secuenciados en el Departamento de Fisiología de la UNAM. La secuencia se analizó mediante análisis por homología usando el programa BLASTN en línea del National Center for Biotechnology Information (NCBI). El fragmento de 922 pb se utilizó para diseñar cebadores específicos (GSP), y de esta forma amplificar el gen por la técnica de amplificación rápida de cDNA por extremos terminales (RACE). Utilizando el kit de amplificación SMART RACE cDNA (Clontech) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cebadores específicos GSP1, 5'-GGGCTGAACCGCACAATGATACAACAGAGG-3' y el cebador GSP2, 5'-CCTCTGTTGTATCATTGTGCGGTTTCAGCCC-3' en combinación con cebadores universales fueron usados para generar los extremos 5'-cDNA y 3'-cDNA terminales respectivamente. El cDNA completo (5'+3') de ambos extremos fue obtenido por una PCR "end to end". Los productos 5'- 3'- y 5'+3'- RACE-PCR resultantes se clonaron en el vector pGEM-T Easy, la secuencia de nucleótidos fue analizada por ambos lados en cuatro plásmidos diferentes. El marco abierto de lectura de la secuencia se predijo con el programa ORF Finder de la NCBI. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se analizaron utilizando el programa BLASTP, ClustalW de la NCBI y el portal de EXPASY Bioinformatics Resource

Portal. El modelo estructural de la enzima se realizó con el programa SWISS MODEL (Arnold *et al.*, 2006).

5.9.4 Análisis de transcritos

El RNA se obtuvo de acuerdo a la metodología propuesta por Liao *et al.* (2004). Para determinar los niveles de mRNA de la STR y SGD, los transcritos fueron analizados mediante una RT-PCR semi cuantitativa. Los oligonucleótidos fueron diseñados de acuerdo a regiones conservadas de los genes para la STR y SGD. El cDNA se obtuvo a partir del RNA de las muestras, utilizando la ThermoScrip™RT (Invitrogen) y el oligonucleótido inverso de cada gen analizado. El amplicón esperado para la STR fue de 490pb con el siguiente par de oligonucleótidos: STRF (5'-TTGTGTGGGAGRRYATATGA-3') y STRR (5'-TCCTCTTTATRTTTCTGGR-3'). La amplificación se realizó con las siguientes condiciones: 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos (94°C por 40 s, 58 °C por 40 s y 72 °C por 1 min) y 10 min a 72 °C. El amplicon esperado para la SGD fue de 900 pb, con el siguiente par de oligonucleótidos: SDGF (5'-AACTCTCTTCCACTGGGATSTTCCCAA-3') y SDGR (5'-TGTACCATATGGCTGAATCCTTTCGGTATCT-3'), con el programa: 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos (94 °C por 40 s, 50 °C por 50 s, 72 °C por 1 min) y 10 min a 72 °C. El gene 18S rRNA se utilizó como gene control, los oligonucleótidos utilizados fueron: 18SF (5' TCC GCT GGC ACC TTA TGA GAA ATC 3') 18SR (5' CGC GTG CGG CCC AGA ACA 3'). La PCR se llevó a cabo con el siguiente protocolo: 94 °C por 2 min seguido de 25 ciclos de amplificación (94 °C por 40 s, 60 °C por 50 s, 72 °C por 1 min) y 10 min a 72 °C. Las imágenes obtenidas de la RT-PCR se analizaron con el equipo Kodak Image Station 2200R, DU® 730.

6. Resultados y Discusión

6.1 Estudio de las enzimas involucradas en la biosíntesis de alcaloides en cultivos de raíces de *U. tomentosa*.

La producción de alcaloides en *U. tomentosa*, se ha asociado como respuesta antioxidante inducida por estrés oxidativo (Trejo-Tapia *et al.*, 2007). En este sentido, se ha reportado (Huerta-Heredia *et al.*, 2009) que el tratamiento de las raíces con 0.2 mM de H₂O₂ indujo la producción de AOM y alcaloides glucoindólicos. Con el propósito de explorar la inducción de la producción alcaloides por otros elicitores, se estudió el efecto del JA y BSO o su combinación. Después de 8 días de tratamiento con 0.2 mM de JA, la producción de AOM y 3 α -dihidrocadambina se indujo 1.3 y 2.3 veces más respectivamente, con respecto al control (473.5 \pm 42.9 μ g/g PS para MOA y 373.0 \pm 17.7 μ g/g PS para 3 α -dihidrocadambina). Mientras que la adición de 0.8 mM de BSO incrementó 1.8 veces, sólo la producción de AOM. Cuando se utilizó la combinación de 0.8 mM de BSO con 0.2 mM de JA, la producción de ambos alcaloides AOM y 3 α -dihidrocadambina fueron incrementados substancialmente, 2.3 y 2.6 veces con respecto al control. De esta manera, se encontró que el BSO potencia el efecto elicitor del JA para la producción de AOM. Cabe destacar que para incrementar la producción de metabolitos secundarios en plantas o cultivos celulares, se ha observado comúnmente que el uso de diferentes elicitores combinados tienen un efecto sinérgico (Zhao *et al.*, 2005). Dado que la STR es requerida para la biosíntesis tanto de AOM como de alcaloides glucoindólicos, y la SGD es necesaria para la biosíntesis de AOM, se seleccionaron los tratamientos que indujeron eficientemente ambos grupos de compuestos, es decir H₂O₂ y la combinación de BSO-JA.

6.1.1 Efecto de la elicitación con H₂O₂ o BSO-JA en el crecimiento de raíces.

En cultivos de raíces de *U. tomentosa*, el estrés oxidativo fue inducido usando H₂O₂ o una combinación de los agentes oxidantes BSO y JA. Después de 8 días de cultivo, la biomasa de las raíces control crecieron 1.8 veces dando una concentración de 9.83 \pm 0.13 PS/L (Fig. 8), mientras que los tratamientos de elicitación con H₂O₂ o

BSO-JA redujeron el crecimiento en un 11 % (8.80 ± 0.25 g PS/L) o en un 20 % (8.16 ± 0.70 g PS/L), respectivamente. La disminución en el crecimiento de los cultivos tratados con BSO-JA estuvo acompañada de un incremento de 2 veces en la producción total de fenoles (3.45 ± 0.01 mg/g PS) con respecto a los cultivos control de raíces (1.15 ± 0.01 mg/g PS). Estos resultados coinciden con los reportados por Yu *et al.* (2002) y Wasternack (2007), quienes observaron que la reducción del crecimiento de las raíces es uno de los primeros efectos fisiológicos después de la adición de JA. Esta disminución se ha correlacionado, en algunos casos, con un incremento en la producción de compuestos fenólicos (Vaughan y Ord, 1990; Ali *et al.*, 2007). Sin embargo, no puede ser descartada, la posibilidad de que la adición directa del BSO a los cultivos de raíces de *U. tomentosa* reduzca el crecimiento, como ocurre con la inhibición de la división celular del meristemo en raíces de *Arabidopsis* tratadas con BSO (Sánchez-Fernández *et al.*, 1997). Las raíces elicidadas con ambos tratamientos de *U. tomentosa* mantuvieron su viabilidad al día 8 como se reflejó por la fluorescencia de las raíces (Fig. 8B). Sin embargo, en el caso de las raíces tratadas con BSO-JA, se observó una ligera disminución de la fluorescencia en la región apical de las raíces (Fig. 8C).

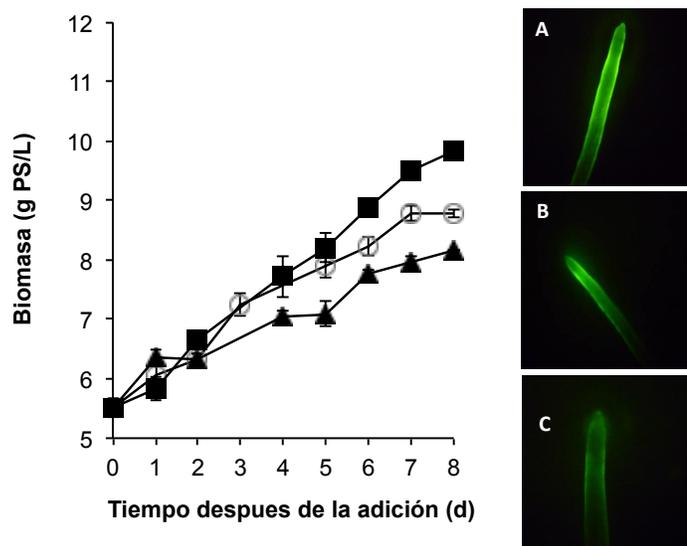


Figura 8. Efecto de la adición de elicitores en el crecimiento y viabilidad de raíces de *U. tomentosa*. Raíces sin tratar (■, A); tratamiento con H₂O₂ (○, B), con BSO-JA (▲, C). La foto de viabilidad es del día 8, después de la adición de los tratamientos. La adición de los elicitores se realizó a los 13 días de cultivo cuando las raíces se encontraban en fase de crecimiento exponencial.

6.1.2 Respuestas enzimáticas antioxidantes bajo condiciones de estrés oxidativo

Las raíces de *U. tomentosa* activan su sistema antioxidante para recoger el exceso de especies reactivas de oxígeno (ERO's) como respuesta al estrés oxidativo. En cultivos de raíces sin tratamiento (control), la actividad de la guayacol peroxidasa (POD) se estimuló ligeramente durante los primeros 3 días del experimento. Posteriormente la actividad enzimática disminuyó hasta alcanzar al día 8 valores cercanos a los iniciales (Fig. 9A). En los cultivos de raíces tratados bien con BSO-JA ó con H_2O_2 , la actividad POD se incrementó gradualmente, alcanzando un máximo de 2 veces respectó al control en el día ocho.

La actividad glutatión reductasa (GR) en cultivos de raíces elicitados con H_2O_2 fue 46 % mayor que la actividad de las raíces de los cultivos control al día cinco. En el caso de las raíces tratadas BSO-JA, la actividad GR fue similar a la de los cultivos control en los días iniciales, menor después del día 5, mostrando una disminución cercana a 50 % al día 8 con respecto a las raíces no tratadas (Fig. 9B).

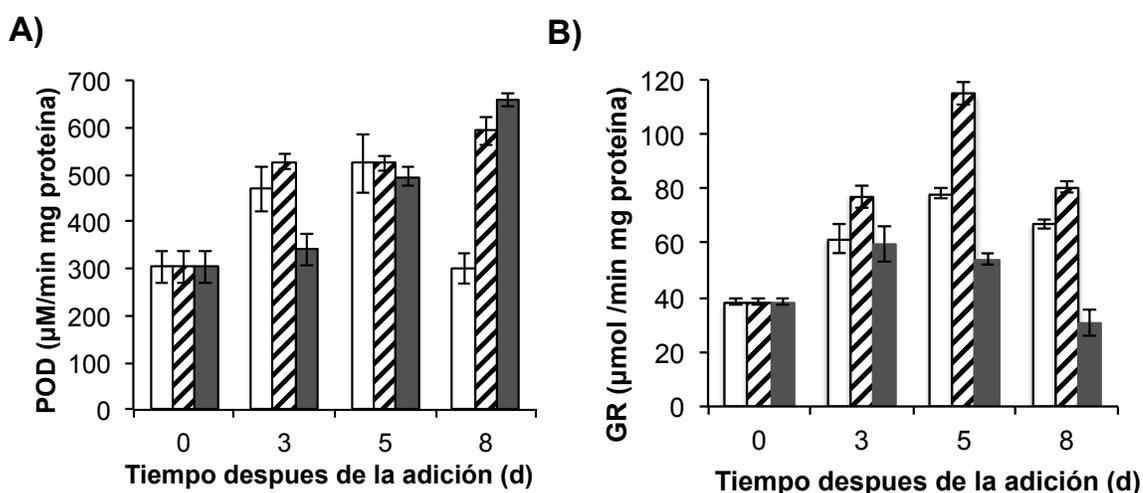


Figura 9. Actividades enzimáticas: **A)** guayacol peroxidasa (POD); **B)** glutatión reductasa (GR), cultivos control (\square) y 0, 3, 5, 8 días después de la adición de H_2O_2 (▨) o BSO-JA (\blacksquare).

El zimograma realizado de las actividades POD y GR tanto para los cultivos de raíces control y elicitados, corroboran que el incremento en la actividad de las enzimas ocurren por la activación de isoformas (Fig. 10). En cultivos elicitados de plantas, el incremento de la actividad peroxidasa se ha encontrado como una respuesta temprana a las condiciones de estrés oxidativo, lo que se ha propuesto pueda proveer resistencia celular al estrés por peróxido (Quan *et al.*, 2008). Por lo tanto, en ambos cultivos de raíces elicitados de *U. tomentosa*, la alta actividad de POD con respecto al control, reflejó que las condiciones de estrés oxidativo estuvieron totalmente presentes incluso al día ocho.

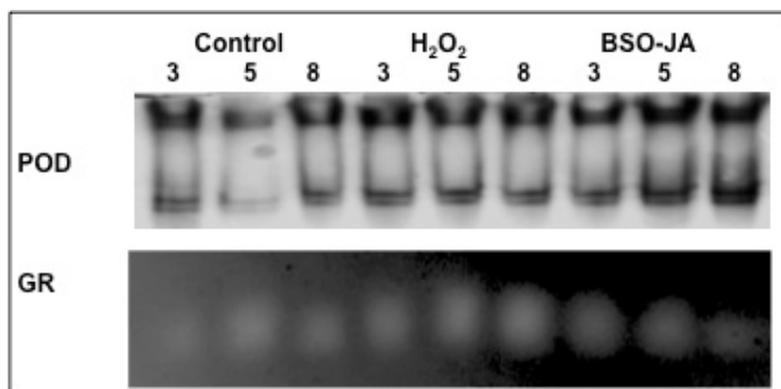


Figura 10. Zimogramas de extractos proteicos de cultivos de raíces de *U. tomentosa*, mostrando las isoformas de glutatión peroxidasa (POD) y glutatión reductasa (GR). Las isoformas a los días 3, 5 y 8 de raíces sin tratamiento (control), elicidadas con H₂O₂ ó BSO-JA.

La glutatión reductasa juega un papel clave en el proceso de defensa antioxidante mediante la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión (GSH), permitiendo de esta manera mantener una relación alta de GSH/GSSG (Foyer y Noctor, 2005). Por lo tanto, el incremento de la actividad GR en cultivos de raíces de *U. tomentosa* elicitados con H₂O₂ podría favorecer el reciclaje de la capacidad antioxidante del glutatión, mientras que las raíces crecidas en presencia de BSO, el cual es un inhibidor específico de la formación del glutatión, podrían éstas estar desprotegidas debido a su disminución. En su lugar, podría ocurrir un incremento en la acumulación de H₂O₂ a nivel celular, junto con la elicitación de metabolitos secundarios, como ha sido reportado por Guo y Ohta (1993). Así mismo, estarían en correlación con la alta actividad de POD para tratar de mantener el equilibrio redox

en la célula al disminuir la actividad GR, en los cultivos tratados con BSO-JA (Fig. 11). Sin embargo, como se ha reportado previamente la disminución en la actividad de la GR podría ser causada por la presencia de fenoles en los cultivos al día 8 (Zhang *et al.*, 1997).

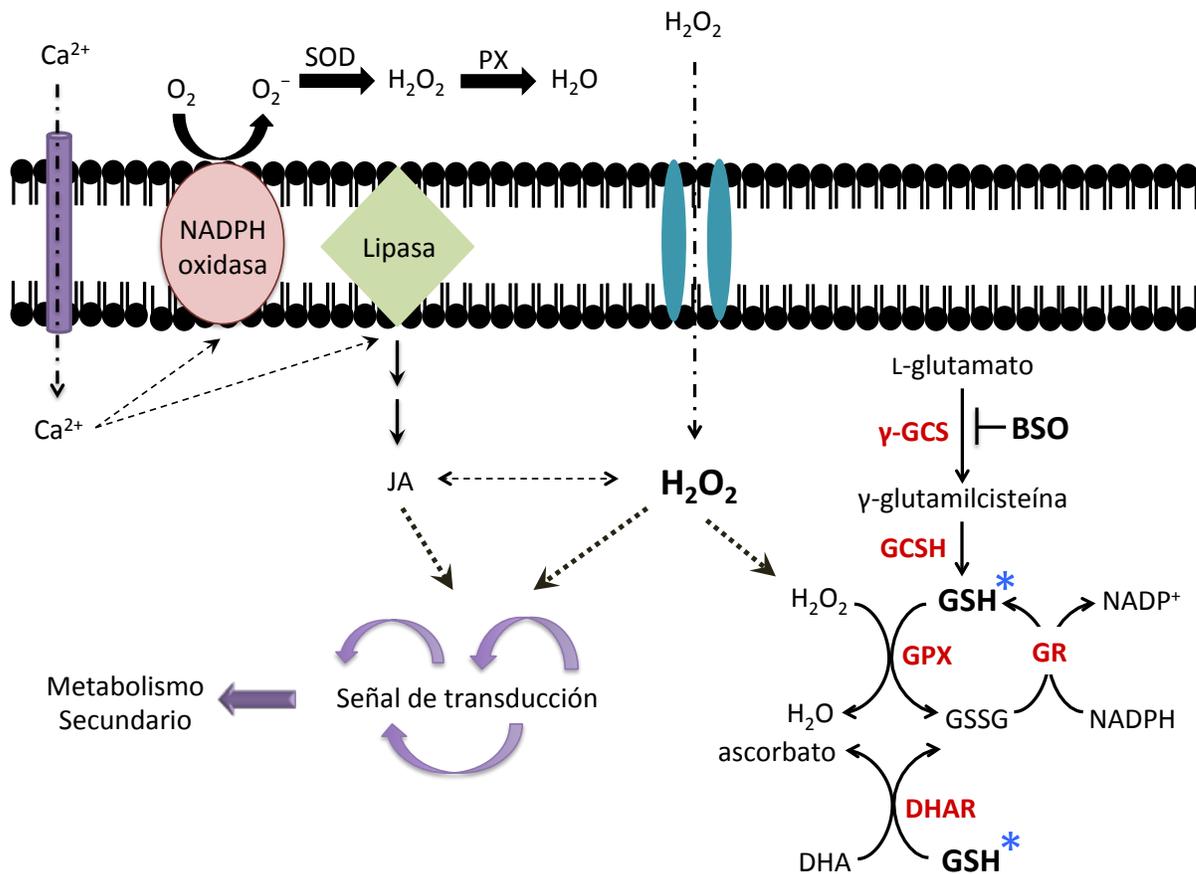


Figura 11. Esquema del mecanismo de activación del metabolismo secundario a través de transducción de señales causada por estrés oxidativo en raíces de *U. tomentosa*. La adición de elicidores H_2O_2 o BSO-JA, causa una cascada de señales las cuales pueden ser: Inducción del flujo intracelular de Ca^{2+} , este a su vez causa la activación de peroxidasas, NADPH oxidasa y de fosfolipasas, que además van a generar otras moléculas señal, como ERO's y JA (Zhao *et al.*, 2005). Todos estos mensajeros van a trabajar interaccionando para inducir la biosíntesis de AIT en *C. roseus* (Memelink *et al.*, 2001). Por otro lado, se sabe que las ERO's activan a moléculas antioxidantes por excelencia como el ascorbato y glutatión (Quan *et al.*, 2008); los cuales al no poder regenerarse en la célula, por la disminución de la concentración del glutatión causada por el BSO, va a provocar un incremento en las ERO's. Mismas que estarían activando la producción de compuestos antioxidantes (Guo y Ohta, 1993) como fenoles y alcaloides (metabolitos secundarios) y de esta manera mantener el equilibrio redox en la célula (Ramos-Valdivia *et al.*, 2012). Especies reactivas de oxígeno (ERO's), jasmonatos (JA), Superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), monodehidroascorbato reductasa (MDAR), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dehidroascorbato (DHA), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), nucleótidos de adenina reducidos (NADPH), nucleótidos de adenina oxidados (NADP+).

6.1.3 Efecto del H₂O₂ en las actividades de enzimas relacionadas a estrictosidina, sus niveles de transcritos y la producción de alcaloides

Las raíces de *U. tomentosa* elicidadas con 0.2 mM de H₂O₂ indujeron, en las primeras 18 h después de la adición, una rápida acumulación de AOM y de los alcaloides glucosidados 3 α -dihidrocadambina y dollicantósido (Fig. 12A), los cuales tuvieron su máximo incremento al octavo día del experimento, produciendo 886.4 \pm 23.6 μ g/g PS de AOM, 847.7 \pm 25.4 μ g/g PS 3 α -dihidrocadambina y 87.5 \pm 7.2 μ g/g PS dollicantósido. La producción de estos compuestos fueron 1.7, 2.1 y 2.3 veces mayor con respecto a sus controles respectivamente (Fig. 15; 534.1 \pm 60.5 μ g/g PS, 398.0 \pm 25.4 μ g/g PS, y 28.1 \pm 4.8 μ g/g PS). La producción de AOM y glucoindol alcaloides, después del tratamiento con H₂O₂, fue precedido por un incremento en las actividades enzimáticas relacionadas a estrictosidina (Fig.12B). Después de 24 h de su adición, la actividad de la STR (93.8 \pm 17.8 pKat/mg de proteína) alcanzó un pico de 1.9 veces con respecto al control (Fig. 15B; 29.0 \pm 0.6 pKat/mg de proteína). Subsecuentemente, la actividad enzimática se mantuvo 40 % por encima de los controles hasta el día 5. Por otro lado, la actividad de la SGD incrementó 2.8 veces después de 6 h de elicitación (245.2 \pm 14.4 pKat/mg de proteína) con respecto a su control (88.6 \pm 19.7 pKat/mg de proteína), mostrando un amplio pico de actividad durante 2 días, seguido por una disminución continua hasta alcanzar el nivel de actividad de esta enzima en los cultivos control. Dado que muchos metabolitos secundarios, incluyendo alcaloides, son tóxicos para las mismas células, las plantas han desarrollado mecanismos para su destoxificación y compartimentalización. En cultivos de raíces de *U. tomentosa*, tanto los controles como aquellos elicitados, los AOM fueron encontrados principalmente en los medios de cultivo, mientras que los alcaloides glucoindólicos 3 α -dihidrocadambina y dollicantósido siempre fueron encontrados dentro de las raíces. Es importante señalar que en plantas y células de *C. roseus*, la STR y estrictosidina son confinadas dentro de la vacuola (McKnight *et al.*, 1990) separadas de la SGD, la cual ha sido localizada en el núcleo (Guirimand *et al.*, 2010b). Por lo tanto, se sugiere una probable compartimentalización para la

acumulación de los glucoindol alcaloides (3 α -dihidrocadambina y dollicantósido) dentro de la vacuola (Vera-Reyes *et al.*, 2013).

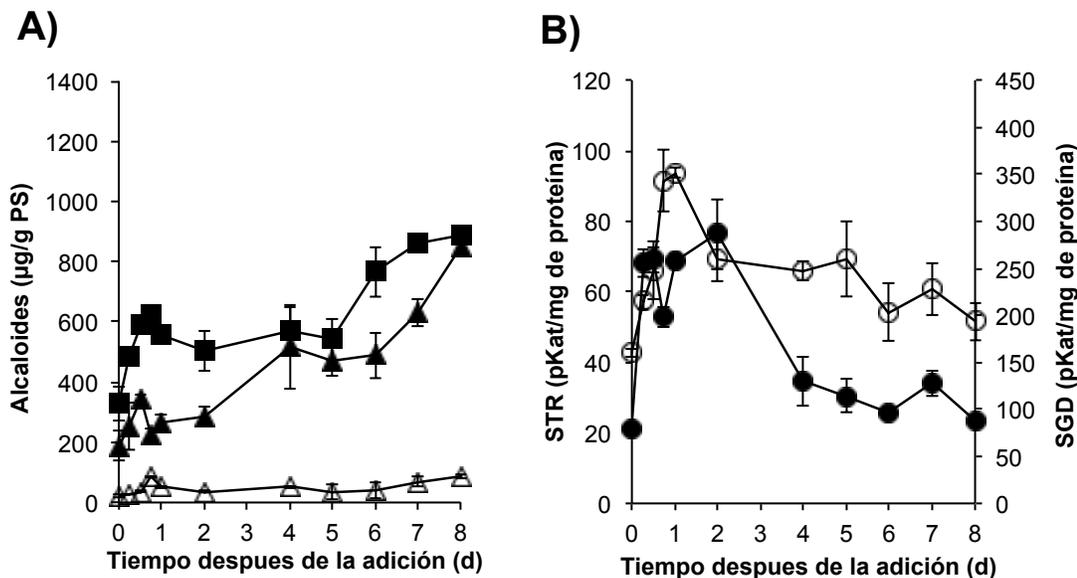


Figura 12. Efecto de la adición de H₂O₂ en raíces de *U. tomentosa* cultivadas en matraces Erlenmeyer. A) Producción de AOM (■); 3 α -dihidrocadambina (▲); y dollicantósido (Δ). B) Actividades específicas de STR (○) y SGD (●). La adición de los elicitors se realizó a los 13 días de cultivo cuando las raíces se encontraban en fase de crecimiento exponencial.

Los niveles relativos de expresión de los genes de *STR* y *SGD* de cultivos de raíces de *U. tomentosa* bajo elicitación con H₂O₂ fueron comparados con cultivos no tratados y analizados por RT-PCR semi-cuantitativa. Las raíces tratadas con H₂O₂ mostraron niveles mayores de *STR* y *SGD*, entre las 48-192 h para *STR* y de 24-48 h para *SGD* después de la elicitación (Fig.13). Los niveles de transcrito de los genes de *STR* y *SGD* fueron sobre expresados por el H₂O₂ en una manera dependiente del tiempo después de la elicitación. Los niveles de los transcritos de la *STR* permanecieron altos 8 días después del tratamiento, mientras que los niveles de transcritos de *SGD* fueron menores que el control en el mismo tiempo. Se ha reportado que en cultivos celulares de *C. roseus*, la expresión del gen *STR* fue rápidamente inducida por elicitors fúngicos (Pasquali *et al.*, 1992), jasmonatos (Menke *et al.*, 1999; Van der Fits y Memelink, 2000) y extractos elicitors de levadura (Pauw *et al.*, 2004), pero no por la adición de H₂O₂ (Pauw *et al.*, 2004). Con respecto a las actividades enzimáticas de la *STR* y la *SGD*, éstas se incrementaron dentro de

los primeros 4-5 días después de la elicitación con H₂O₂ (Fig.12B) en correlación con un aumento de los niveles de expresión de los RNAm de *STR* y *SGD* durante las primeras 48 h de tratamiento (Fig. 13) y en correspondencia con el incremento en la producción de alcaloides.

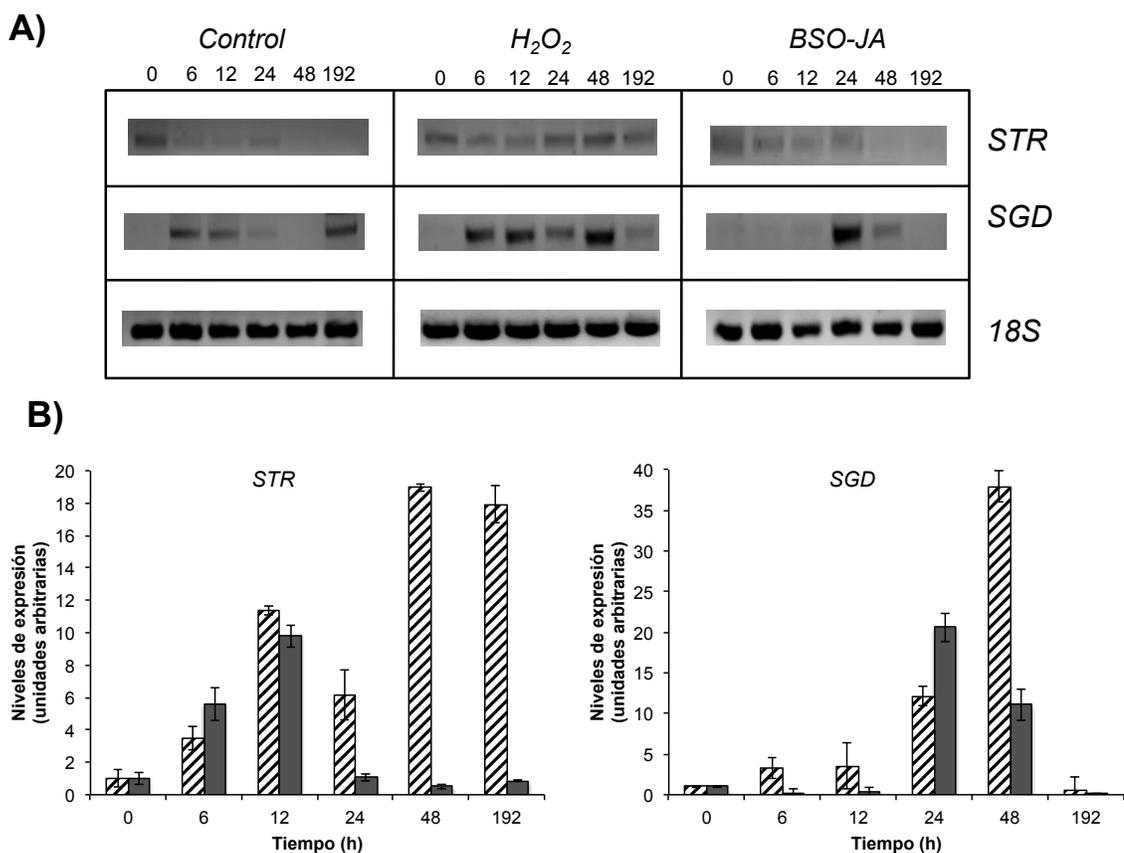


Figura 13. Efecto de elicitors en los niveles de transcritos de los genes *STR* y *SGD* mediante RT-PCR semi-cuantitativa, en cultivos de raíces de *U. tomentosa*. A) Los productos amplificados (0, 6, 12, 48 and 192 h) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (306 nm). Se muestra una imagen inversa del gel teñido. B) Representación gráfica de los resultados de la RT-PCR, las unidades son arbitrarias, adición de H₂O₂ (▨) o BSO-JA (■). El análisis representado en las barras fue utilizando los valores promedio del análisis por triplicado de la RT-PCR. Los resultados representan el incremento con respecto a las raíces no tratadas.

6.1.4 Efecto del BSO-JA en las actividades de enzimas relacionadas a estrictosidina, sus niveles de transcrito y la producción de alcaloides

La producción de alcaloides de cultivos de raíces de *U. tomentosa* tratados con BSO-JA mostró, como ocurre en los cultivos de raíces elicitados con H₂O₂, un

incremento en la producción de AOM, 3 α -dihidrocadambina y dollicantósido. Sin embargo, en este caso, se observó una respuesta bifásica (Fig. 14) a las 12 h y al día 8 después de la adición del tratamiento. El pico transitorio a las 12 h para AOM, 3 α -dihidrocadambina y dollicantósido alcanzó 743.5 ± 9.6 $\mu\text{g/g}$ PS (2.2 veces), 902.7 ± 10.2 $\mu\text{g/g}$ PS (5.9 veces), y 123.6 ± 18.3 $\mu\text{g/g}$ PS (7.5 veces), respectivamente. El segundo máximo produjo 1077.0 ± 75.8 $\mu\text{g/g}$ PS, 977.7 ± 21.9 $\mu\text{g/g}$ PS y 150.5 ± 9.2 $\mu\text{g/g}$ PS, lo que corresponde a 2.0, 2.5 y 4 veces con respecto a los cultivos control de raíces. Se ha reportado que el BSO induce estrés oxidativo ya que al inhibir a la γ -glutamylcistein sintasa (γ -GCS) impide la formación de glutatión. Estudios previos de Guo y Ohta (1993), demostraron un incremento en la producción del metabolito secundario cuando se empleó BSO solo; o en una combinación con extracto de levadura éstos tratamientos promovieron un incremento en el H₂O₂ a nivel celular. Por lo tanto, la elicitación con BSO-JA probablemente proporciona un ambiente fisiológico apropiado para las reacciones de oxidación y oxigenación, las cuales son comunes en la biosíntesis de alcaloides, tales como para la condensación de vindolina y catarantina para dar lugar a vinblastina o para la oxidación de ajmalicina a serpentina realizadas por peroxidasas presentes en la vacuola de *C. roseus* (Zhao *et al.*, 2005). En cultivos celulares de *U. tomentosa* cultivadas en biorreactores y utilizando azida, propil galato, ácido salicil hidroxámico (SHAM) como inhibidores de POD, se reportó una correlación positiva entre el incremento de la actividad enzimática de peroxidasas, NAD(P)H oxidasas, el nivel endógeno de H₂O₂ y la producción de AOM (Huerta-Heredia *et al.*, 2009).

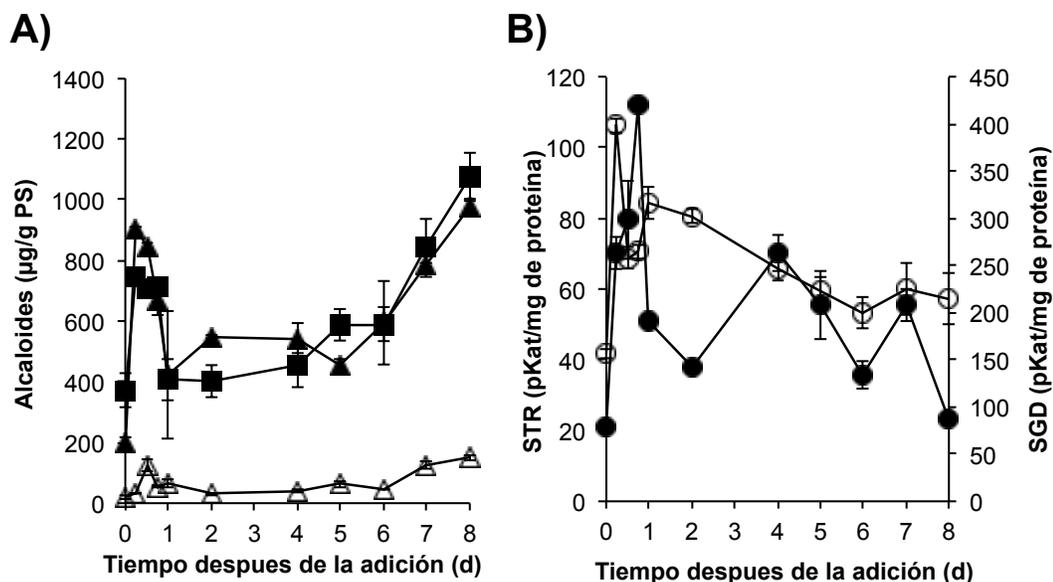


Figura 14. Efecto de la adición de BSO-JA en raíces de *U. tomentosa* cultivadas en matraces Erlenmeyer. A) Producción de AOM (■); 3α-dihidrocadambina (▲); y dolicantósido (△). B) Actividades específicas de STR (○) y SGD (●). La adición de los elicitores se realizó a los 13 días de cultivo cuando las raíces se encontraban en fase de crecimiento exponencial.

En consecuencia, los tratamientos con BSO-JA incrementaron las actividades STR y SGD. La STR alcanzó un pico a las 6 h después de la adición de BSO-JA, incrementando su actividad 2.5 veces (102.7 ± 2.2 pKat/mg de proteína) comparado con las raíces control (41.6 ± 4.0 pKat/mg de proteína) (Fig. 15B), seguido de un incremento sostenido en su actividad de 1.7 veces mayor con respecto al control, dentro de las primeras 48 h. Posteriormente, la actividad STR disminuyó gradualmente hasta alcanzar niveles similares a los alcanzados en cultivos de raíces controles (Fig. 14B y 15B). La actividad SGD tuvo un pico después de 18 h de tratamiento, mostrando 4.2 veces más actividad (421.2 ± 1.8 pKat/mg de proteína) que el control (100.8 ± 17.7 pKat/mg de proteína) seguido de un pico menor de actividad enzimática en el día 4 después de la elicitación (Fig. 14B). El incremento en la producción de alcaloides observado con el tratamiento BSO-JA, que ocurre en una manera bifásica, está en relación con el incremento significativo en STR y los dos máximos observados en la actividad SGD. Sin embargo, se observó un patrón diferente en el nivel de abundancia de los RNAm de estas enzimas con respecto a la elicitación de H_2O_2 . Los transcritos de STR se incrementaron durante las primeras 12 h mientras que la expresión de SGD no fue inducible en este periodo y alcanzó un

máximo 24 h después del tratamiento, comparado con los niveles de los cultivos controles (Fig. 13). El nivel de transcrito que está reportado para *SGD* no se correlaciona con el primer pico de la actividad de la enzima. Este comportamiento puede reflejar la presencia de un mecanismo regulatorio complejo para la expresión genética de esta enzima, como la regulación por promotores que ha sido reportada en *C. roseus* (Pebbles *et al.*, 2009). Por otro lado, está reportado que en cultivos de tejidos diferenciados, el incremento de la acumulación de alcaloides vía elicitación con jasmonato en cultivos de raíces pilosas, está correlacionada con un incremento de la expresión de *STR* y *SGD* (Goklany *et al.*, 2009), mientras que en cultivos de brotes los niveles de transcrito de *SGD* (Shukla *et al.*, 2010) fueron sobreexpresados. Sin embargo, se encontró una disminución en los niveles de transcrito de *SGD* cuando se elicató con JA cultivos de raíces pilosas, a los que se les había sobreexpresado el factor de transcripción *ORCA3* (Pebbles *et al.*, 2009). Ésto indica que esta enzima probablemente este regulada por otros factores de transcripción con respecto a los genes de la TDC y *STR* (Menke *et al.*, 1999; Pauw y Memelink; 2005).

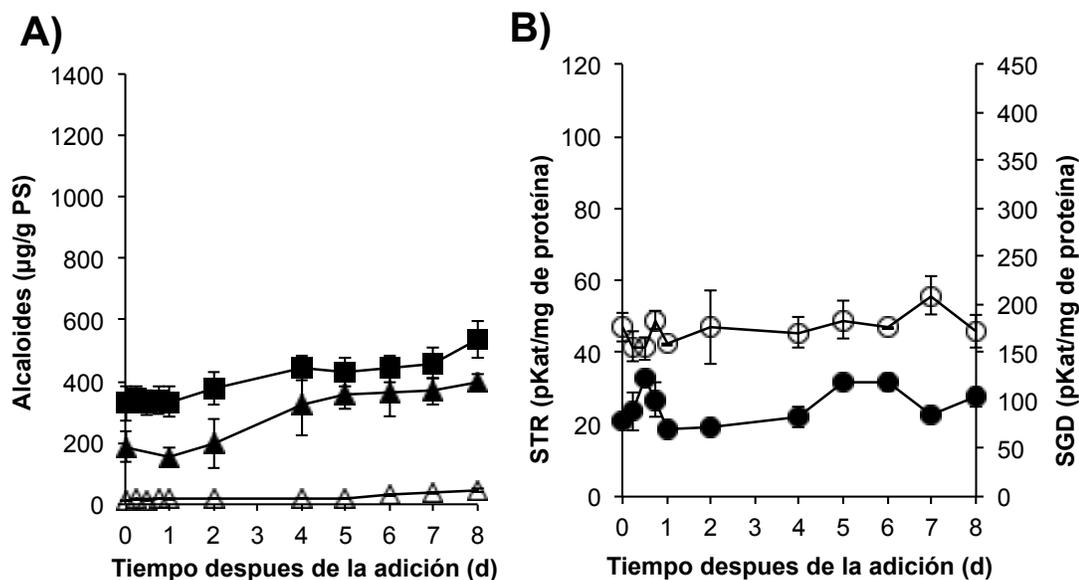
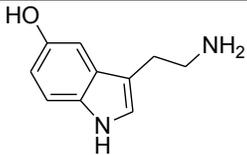
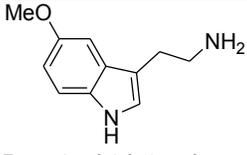
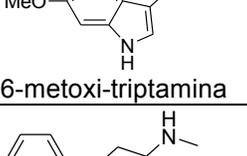
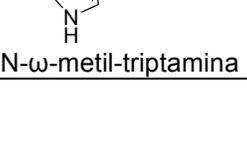


Figura 15. Cultivos de raíces sin tratamiento (controles) de *U. tomentosa* cultivadas en matraces Erlenmeyer. A) Producción de AOM (■); 3α-dihydrocadambina (▲); y dolicantósido (Δ). B) Actividades específicas de STR (○) y SGD (●).

6.1.5 Conversión enzimática de N- ω -metiltriptamina y secologanina en dollicantósido

Se evaluó la capacidad de los extractos enzimáticos de cultivos de raíces de *U. tomentosa* para la formación *in vitro* de dollicantósido. Para tal objetivo se obtuvo un extracto protéico desalado a partir de las raíces de *U. tomentosa* cultivadas en matraces Erlenmeyer. Los extractos mostraron una actividad STR de 50.5 ± 4.2 pKat/mg de proteína, con los sustratos de esta reacción enzimática, la secologanina y triptamina. Con el fin de evaluar la capacidad de los extractos de aceptar otros sustratos y producir diferentes compuestos se probaron diferentes precursores triptamínicos, manteniéndose en ellos el sustrato fijo de secologanina según se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Sustratos triptamínicos probados en la reacción enzimática de STR de *U. tomentosa*.

Compuesto	Actividad (pKat/mg de proteína)
 5-hidroxi-triptamina	Sin actividad
 5-metoxi-triptamina	Sin actividad
 5,6-dihidroxi-triptamina	Sin actividad
 6-metoxi-triptamina	Sin actividad
 N- ω -metil-triptamina	20.7 ± 4.3

Se obtuvo reacción cuando la N- ω -metiltriptamina fue utilizada como sustrato junto con la secologanina por lo tanto, la transformación se estudió ampliamente, incubando con un extracto proteico semipurificado de raíces de *U. tomentosa* dando como producto el dollicantósido exhibiendo una actividad de 20.7 ± 4.3 pKat/mg de proteína. Este valor representó aproximadamente la séptima parte de la actividad específica de STR (137.6 ± 3.3 pKat/mg de proteína). Los productos de reacción fueron analizados por HPLC y LC/ESI-MS (Fig. 16) mostrando, que además del dollicantósido, se encontró la presencia de dos productos relacionados cuya información de masa espectral corresponde al dihidro-dollicantósido (m/z 547) y al isodollicantósido (m/z 545) (Achenbach y Benirschke, 1996). Dado que la STR de *Rauwolfia serpentina* no puede aceptar N- ω -metiltriptamina como sustrato, en plantas productoras de dollicantósido Treimer y Zenk (1979) postularon que el paso de metilación podría ocurrir después de la formación de estrictosidina por la presencia de N-metiltransferasas que deberían metilar este compuesto después de su formación (Treimer y Zenk, 1979; Stöckigt *et al.*, 2008). Sin embargo, es importante notar que el dollicantósido no es producido por *C. roseus* o por *R. serpentina*. Por lo tanto, sólo el aislamiento y caracterización de una enzima de una planta productora de dollicantósido y que pueda formarlo, como es el caso de plantas de género *Strychnos* (Angenot *et al.*, 1971) o raíces de *U. tomentosa*, podría aclarar si la STR u otra enzima relacionada es responsable de catalizar esta condensación.

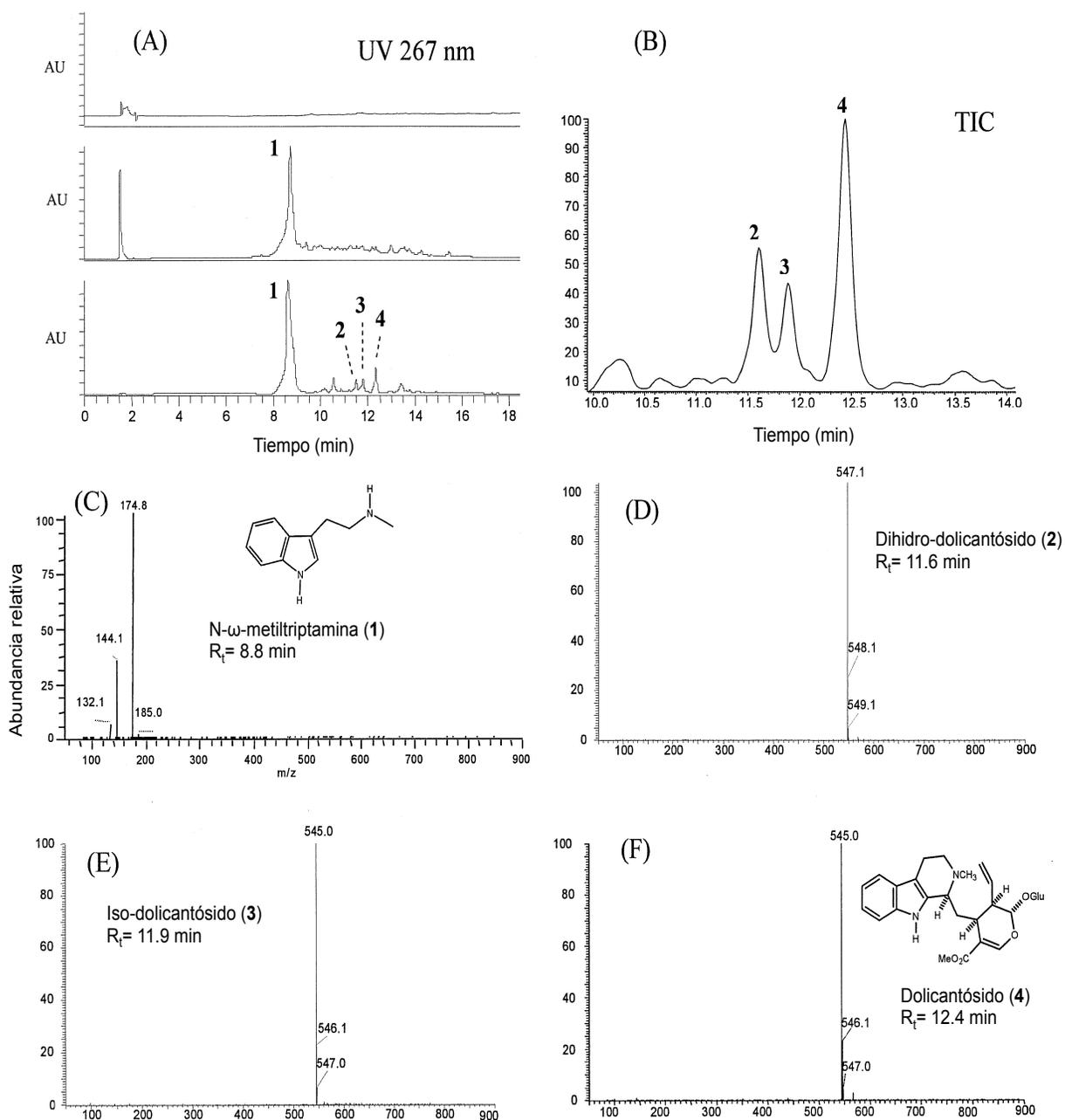


Figura 16. A) Cromatograma de líquidos de alta resolución con arreglo de diodos del producto de reacción entre la *N*- ω -metiltryptamina y la secologanina en presencia de un extracto proteico semipurificado de raíces de *U. tomentosa*. Trazo superior: extracto proteico; trazo central: *N*- ω -metiltryptamina (**1**) como sustrato; trazo inferior: productos de reacción (**2-4**) y sustrato remanente (**1**). (B) Cromatograma de iones totales (TIC) de los productos de la reacción enzimática. (C-F) Espectros de masas por electroespray (ESI) de la *N*- ω -metiltryptamina (**1**) que muestran al ión $[M+1]^+$ en m/z 175, un derivado del dihidrodolicantósido (**2**) que muestra al ión $[M+1]^+$ en m/z 547, un derivado del isodolicantósido (**3**) con $[M+1]^+$ en m/z 545 y el dolicantósido (**4**) con $[M+1]^+$ en m/z 545.

Nuestros resultados muestran que en cultivos de raíces de *U. tomentosa*, el incremento en la producción de MOA y de los alcaloides glucoindólicos 3 α -dihidrocadambina y dollicantósido está asociado con el estrés oxidativo provocado por los elicitores H₂O₂ y BSO-JA, siendo el último el mejor tratamiento. Las enzimas relacionadas a la strictosidina, STR y SGD, podrían tener un papel regulatorio en la biosíntesis de alcaloides como se mostró por el incremento en sus actividades después de la elicitación, mientras que en los niveles de transcritos de RNAm ocurrió un patrón diferente con respecto al tiempo para ambos genes. Estos resultados revelan la existencia de redes regulatorias complejas que podrían controlar la biosíntesis de MOA y alcaloides glucoindólicos en cultivos de raíces de *U. tomentosa*. Adicionalmente, se encontró que un extracto proteico parcialmente purificado de raíces de *U. tomentosa* posee la habilidad de catalizar la formación de dollicantósido a partir de *N*- ω -metiltriptamina y secologanina. Este estudio provee información útil en relación con aplicaciones biotecnológicas de cultivos de raíces de *U. tomentosa* para la producción de alcaloides indólicos y glucoindólicos.

6.2 Purificación de la strictosidina β -glucosidasa a partir de cultivos de células en suspensión de *U. tomentosa*

El extracto de proteínas fue obtenido a partir de cultivos de células de *U. tomentosa* sometidas a estrés oxidativo según lo reportado por Marín (2009). Las células se cultivaron en un reactor de 7 L, y fueron elicidadas durante la fase de crecimiento exponencial con 0.2 mM de H₂O₂. La muestra fue obtenida 12 horas después de la adición del elicitor; el extracto proteico tenía una actividad de 164.84 nmol/seg, 2.9 veces mayor con respecto a células antes del tratamiento (56.97 nmol/seg). La SGD fue purificada a partir de los extractos elicitados de *U. tomentosa* utilizando una modificación del método descrito por Geerlings (1999). Se siguió varios pasos de purificación, los cuales incluyeron una precipitación con sulfato de amonio (15-45%). La enzima fue eluida de una columna cromatográfica de intercambio aniónico (HiTrap Q FF/ 1 ml) en dos pasos. En el primer paso se encontraron cuatro fracciones que contenían la actividad de la SGD, las cuales fueron recolectadas, desaladas en una columna PD-10 para así cuantificar la actividad de la enzima.

Posteriormente las fracciones se juntaron y se concentraron hasta un mililitro utilizando CENTRICON YM-30 (Millipore). La fracción concentrada se inyectó nuevamente en la columna de intercambio aniónico, encontrando tres fracciones que tenían actividad de SGD, que eluyeron a 0.4 M de NaCl, con un pico mayoritario de actividad enzimática que corresponde al pico de elución de la proteína en esa concentración de eluyente. Las fracciones colectadas fueron desaladas y concentradas como se mencionó anteriormente hasta obtener 500 μ l (Fig. 17, Tabla 3).

Tabla 3. Purificación de la strictosidina β -glucosidasa de cultivos de células elicidadas de *U. tomentosa* en biorreactor.

Fracción	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad (nmol.s ⁻¹)	Actividad específica (nmol.s ⁻¹ .mg ⁻¹)	Factor purificación	Rendimiento
Extracto crudo	850	790.5	164.85	0.208	1	100
Precipitación ^a (45%)	50	76	49.78	0.655	3.2	30.2
Ultrafiltración	10	96	105.34	1.09	5.3	63.9
Mono Q FF ^b	2	1.14	12.89	11.31	54.4	7.8
Mono Q FF ^c	0.5	0.175	5.77	32.96	158.5	3.5

^a La cuantificación de la actividad se realizó luego de desalar la muestra (columna PD-10).

^{b,c} La cuantificación de la actividad se realizó luego de desalar la muestra (columna PD-10) y concentrar utilizando columnas CENTRICON YM-30 (Millipore), con una membrana 30 KDa.

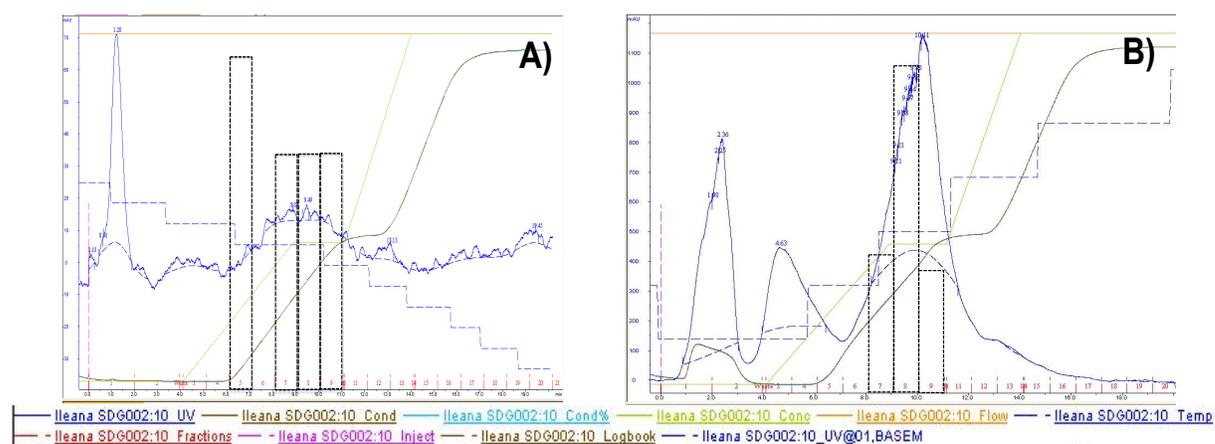


Figura 17. Purificación de strictosidina β -glucosidasa (SGD) de células en suspensión de *U. tomentosa* elicidadas con H₂O₂. A) Primer pasó de cromatografía de intercambio aniónico; B) Segundo paso de cromatografía de intercambio aniónico. — UV, absorbencia a 280 nm; --- Actividad enzimática de la SGD en pKat/mg; ____ Gradiente de NaCl.

Las fracciones fueron analizadas en un gel de electróforesis (SDS-PAGE), en donde se observa en los carriles 4 y 5 (Fig. 18), una banda específica de aproximadamente 60 KDa se intensifica con los pasos de purificación. Esta banda corresponde a las masas moleculares reportados para las SGD de *C. roseus* y *R. serpentina* (Stevens *et al.*, 1992; Luijendijk *et al.*, 1998; Hallard, 1998; Geerlings *et al.*, 2000;), así como a otras de la familia 1 de las glicosil hidrolasas en la cual la SGD (EC 3.2.1.105) ha sido clasificada (Henrissat y Bairoch, 1996).

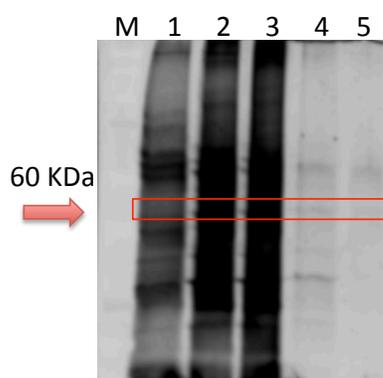


Figura 18. Fracciones obtenidas del proceso de purificación de la strictosidina β -glucosidasa de *U. tomentosa*. Gel electroforético del 12 % (SDS-PAGE). M, marcador de peso molecular; 1, Extracto crudo; 2, fracción del 45 %; 3, ultrafiltración; 4, Primer paso de cromatografía columna HiTrap Q FF; 5, Segundo paso de cromatografía columna HiTrap Q FF. Tinción del gel con SYPRO® Ruby.

Para obtener la secuencia de aminoácidos de la SGD, la banda purificada de 60 KDa fue cortada del gel y se envió al servicio de secuenciación de proteínas (Arizona proteomics) de la Universidad de Arizona. Mediante el programa Scaffold3, que busca secuencias homólogas en bases de datos, se encontró que la secuencia KIGLDAYRFSISWSR, tuvo homología con regiones conservadas de β -glucosidasa incluyendo las involucradas en la biosíntesis de alcaloides. En la figura 19 se puede observar que hay aminoácidos que son iguales mientras otros son residuos de aminoácidos similares. Por lo que la secuencia tuvo una identidad del 100% con la supuesta strictosidina β -glucosidasa de *C. acuminata* (Ca_PSGD, n° de acceso, JF508379) y con la rauciffricine β -glucosidasa de *R. serpentina* (Rs_RGD, n°. de acceso, Q9SPP9); el 79% de identidad con la SGD de *Mitragyna speciosa* (n° de acceso, JF412824.1), el 74% con la β -glucosidasa de *Psychotria ipecacuana*

(Ipeglu1, nº de acceso, B6ZKM7); el 71% con una supuesta estrictosidina β -glucosidasa de *U. tomentosa* (Ut_PSGD, nº de acceso, JQ3666085) y del el 68% con la SGD de *C. roseus* y la de *R. serpentina* (Cr_SGD, nº. de acceso, Q9M7N7 y Rs_SGD, nº. de acceso, Q8GU20 respectivamente). Con los resultados anteriores se puede concluir que se encuentra homogéneamente pura la SGD de *U. tomentosa*.

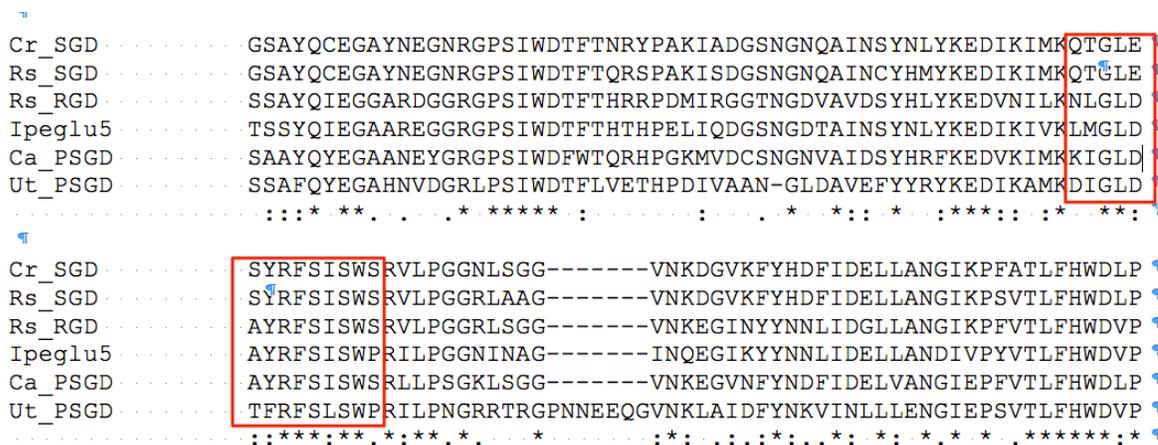


Figura 19. Secuencia de aminoácidos encontrada en la SGD purificada de *U. tomentosa*. Comparada con secuencias de aminoácidos de la SGD de *Uncaria tomentosa* (Ut_PSGD, nº de acceso, JQ3666085) y con secuencias de aminoácidos de otras plantas, *Catharanthus roseus* (Cr_SGD, nº. de acceso, Q9M7N7); *Rauvolfia serpentina*, (Rs_SGD, nº. de acceso, Q8GU20); *Rauvolfia serpentina*, rauciffricine β -glucosidasa (Rs_RGD, nº. de acceso, Q9SPP9); *Psychotria ipecacuana*, β -glucosidasa (Ipeglu1, nº de acceso, B6ZKM7); *Camptotheca acuminata*, supuesta SGD (Ca_PSGD, nº de acceso, JF508379). En los cuadros rojos se señala la secuencia de aminoácidos encontrada.

6.2.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la SGD de *U. tomentosa*

Se llevaron a cabo los ensayos de actividad enzimática para la SGD de *U. tomentosa* a diferentes pH utilizando diversos amortiguadores. La concentración final de sales en los diferentes amortiguadores fue de 100 mM, el amortiguador en el que se encontraba la SGD de *U. tomentosa* fue cambiado mediante columnas (Micro BioSpin® 30, BioRad) con el amortiguador utilizado en el ensayo. Usando el amortiguador de fosfatos se encontraron dos picos de pH de la SGD de *U. tomentosa* uno de 5 (8.14 nKta/mg de proteína) y otro de 6.3 (8.15 nKat/mg de proteína), se observó que la actividad se mantenía desde pH 4 hasta 6.3 (Fig. 20). Sin embargo, conforme el pH se basificaba la actividad se veía disminuida drásticamente. La SGD de *T. divaricata* presentó un pH óptimo entre 4.5-5.0, mostrando dos picos con una

diferencia mínima en la actividad entre ellos (Luijendijk, 1995). El amortiguador Tris mostró una pérdida total de la actividad enzimática a partir de pH 7.5. El rango de pH de la SGD de es de 4-6.5 dependiendo de la sal utilizada como amortiguador, teniendo la misma actividad en el amortiguador citrato a pH 5 o pH 6.3 con amortiguador de fosfatos (Fig. 20). Los pH óptimos reportados para la SGD en *C. roseus* fue de 6-6.4 (Hemscheidt y Zenk, 1980; Luijendijk *et al.*, 1998). En *T. divaricata* se reportaron dos isoformas de la enzima una con pH óptimo de 7 y la otra con pH óptimo de 5.3 (Luijendijk, 1996a,b). Barleben y colaboradores (2007) reportaron un pH óptimo de 5-5.2 para la SGD de *Rauvolfia serpentina*. Por lo cual nuestros datos estarían coincidiendo con la SGD reportada para *R. serpentina*.

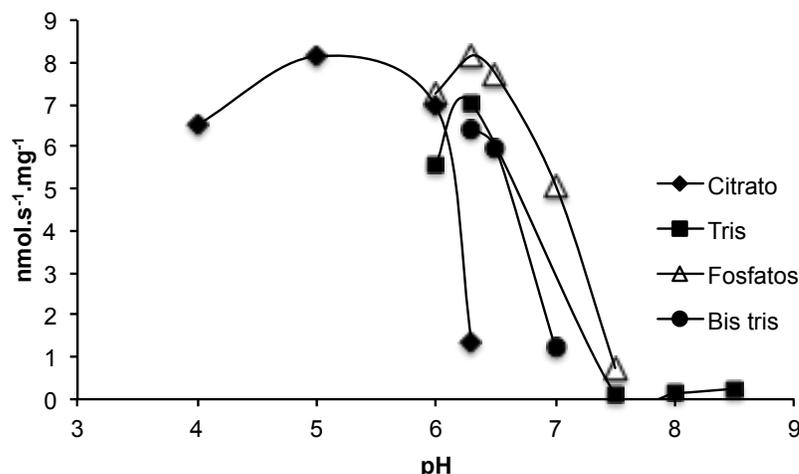


Figura 20. Actividad de la estrictosidina β -glucosidasa en relación con el pH del utilizado en la reacción (los amortiguadores se prepararon a una concentración de 100mM).

6.2.2 Inhibición de la actividad de la SGD de *U. tomentosa* por la presencia de D (+) ácido glucónico- δ -lactona

El D (+) ácido glucónico- δ -lactona, también llamado gluconolactona es un eficaz inhibidor de ciertas exo-1,3- β -glucanasas y β -glucosidasas (Conchie y Levvy, 1957). En estudios previos se ha utilizado a la gluconolactona para medir la actividad de la STR en *U. tomentosa* (Santos-Mendoza, 2010). Para este ensayo se probaron diferentes concentraciones de gluconolactona, siendo las concentraciones menores de 50 mM las que no tuvieron efecto en la actividad enzimática de la STR. La

concentración máxima probada de gluconolactona fue de 200 mM, ya que este compuesto debido a su acidez modifica el pH, por lo que era difícil mantener el pH en el volumen de reacción utilizado (500 μ l). El porcentaje de inhibición alcanzado con 200 mM de gluconolactona fue del 77.51% (1.58 nKat/mg), con respecto a un control el cual no lo contenía (7.024 nKat/mg). Este resultado es muy parecido al reportado para *C. ledgeriana* en el cual a una concentración de gluconolactona de 200mM se obtiene cerca de un 80% de inhibición (Luijendijk, 1995). La inhibición de la actividad enzimática de la SGD por este compuesto ha sido reportada también para *C. roseus* y *R. serpentina* en donde se observó que la actividad de la enzima es inhibida aproximadamente en un 55 a 33% a concentraciones mayores de 100 mM mientras que usando estas concentraciones en *R. sellowii* la actividad fue inhibida en un 80 % (Luijendijk *et al.*, 1996a; Geerlings *et al.*, 1999; Gerasimenko *et al.*, 2002).

6.2.3 Determinación de los parámetros cinéticos de la SGD de *U. tomentosa*

Los parámetros cinéticos fueron determinados utilizando estrictosidina como sustrato en un rango de concentración de 0.7-3 mM. También se realizó un estudio preliminar en el cual se utilizó dollicantósido (no puro el cual puede tener otros contaminantes) como sustrato, sin embargo la actividad de la enzima no fue detectada dentro de las primeras 24 h de reacción, por lo que es necesario optimizar las condiciones de reacción con dollicantósido como sustrato. Los valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y de velocidad máxima (V_{max}) usando estrictosidina como sustrato fueron calculados por dos métodos diferentes, Lineweaver and Burk y Hanes-Woolf (Fig. 21).

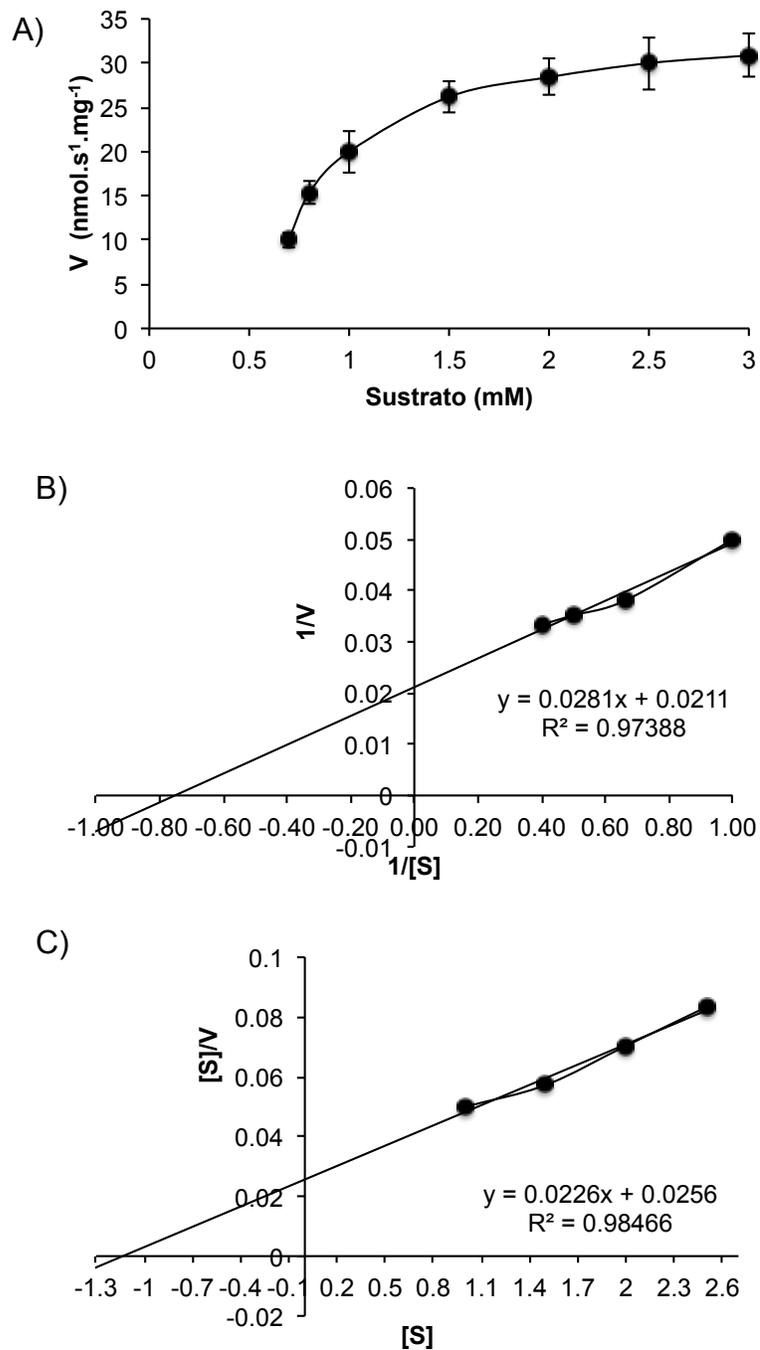


Figura 21. Determinación de los parámetros cinéticos de la SGD de *U. tomentosa* con strictosidina; A) Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción, cinética de Michaelis-Menten; B) Representación Lineweaver-Burk; C) Representación Hanes-Woolf.

En la gráfica A (Fig. 21) se observa el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción, siguiendo una cinética Michaelis-Menten. Para la

determinación de los parámetros cinéticos se utilizaron los datos observados en intervalo lineal para hacer los cálculos correspondientes. En la tabla 4 se observan los valores comparativos de K_m y V_{max} calculados por dos métodos, los cuales son muy parecidos entre sí. Sin embargo la mejor correlación de los datos los dio en ensayo Hanes-Woolf ($r^2= 0.9846$) resultando en una K_m de 1.09 mM y una V_{max} de 42.75 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, sugiriendo ser los mejores parámetros cinéticos. Los parámetros cinéticos reportados de la SGD de *C. roseus*, *R. serpentina* y *T. divaricata* calculados con dos métodos son diferentes a los encontrados para la de *U. tomentosa*. En el caso de la SGD de *C. roseus* tiene una K_m 0.2-0.1 mM y una V_{max} 180-230 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Luijendijk, 1998); la de *R. serpentina* K_m 0.12 mM y una V_{max} 347 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Gerasimenko *et al.*, 2002); la de *T. divaricata* 1.43-0.25 mM y una V_{max} 370 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ (Luijendijk, 1995). La constante de Michaelis es la concentración de sustrato necesario para que se realice una catálisis más eficaz. Por lo que una enzima con una K_m alta requiere mayor concentración de sustrato para alcanzar una velocidad de reacción dada, que una enzima con baja K_m . La diferencia entre los valores puede deberse a la diferencia de familias a las que pertenece la enzima o también al grado de pureza de la enzima el cual puede estar causando esta diferencia.

Tabla 4. Valores de K_m y V_{max} utilizando como sustrato strictosidina de la SGD de *U. tomentosa*.

	K_m (mM)	V_{max} ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
Lineweaver-Burk	1.65	36.36
Hanes-Woolf	1.09	42.75

6.2.4 Identificación de los productos de reacción de la SGD de *U. tomentosa*

Para la identificación de los productos de la reacción enzimática (Catenamina y 5-6 dihidroflavoperirina) se realizaron placas de HPTLC, en donde se probaron los siguientes sistemas de solventes: I, CHCl_3 : EtOH, 30:1; II, CHCl_3 : MeOH, 4:1 (Stöckigt, 1978); III, n-butanol: ácido acético: H_2O , 4:1:1 (Geerlings, 2000).

Una característica de la reacción catalizada por la SGD es la producción de un color amarillo derivado de la hidrólisis de la estricitosidina, el cual ha servido para identificar que la reacción se lleva a cabo funcionalmente en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con los genes de STR y SGD (Geerlings, 1999; Bernhardt *et al.*, 2007). El ensayo se realizó siguiendo la reacción en tres diferentes tiempos 1, 4 y 24 horas para observar algún incremento en el color con respecto del tiempo. El cambio de color fue evidente en los tres tiempos, para poder identificar los compuestos producto de la reacción de hidrólisis de la estricitosidina y del compuesto al que se le atribuye el color de la reacción, las reacciones se pararon basificando con NH_4OH (72 mM) ajustando el pH a 8.0 aproximadamente, posteriormente se realizó una extracción de los compuestos para identificar catenamina se realizó una extracción con acetato y para identificar 5-6 dihidroflavoperirina causante del color amarillo en luz visible (Geerlings, 1999) se extrajo con cloroformo.

De la extracción con acetato de etilo se identificó la formación de catenamina, mediante una cromatografía de capa fina (TLC), utilizando como fase móvil CHCl_3 : EtOH (30:1). En la figura 22 se observa una banda con un factor de retención (R_f) de 0.59 correspondiente a la catenamina con respecto a lo reportado por Stöckigt (1978). Entre sus características se observa una banda color marrón a una longitud de onda de 254 nm y color amarilla al observarla a 366 nm. Por lo que el producto de la reacción de la SGD en *U. tomentosa* es catenamina.

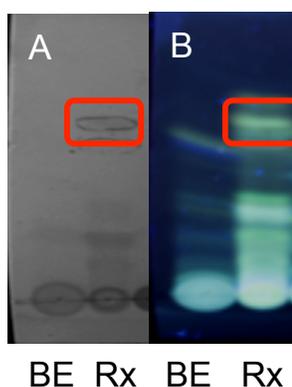


Figura 22. TLC identificación de catenamina R_f 0.59, fase móvil CHCl_3 : EtOH (30:1). A) Placa de TLC a 264 nm B) Placa de TLC a 366 nm. BE, blanco enzima; Rx; reacción

Szabó (2008b) propone que a partir de la producción de catenamina se pueden estar formando otro intermediario como lo es ajmalicina hidroxí-indolina, el cual al ciclarse puede producir un precursor que por oxidaciones posteriores formará a los alcaloides oxindólicos (Fig. 23).

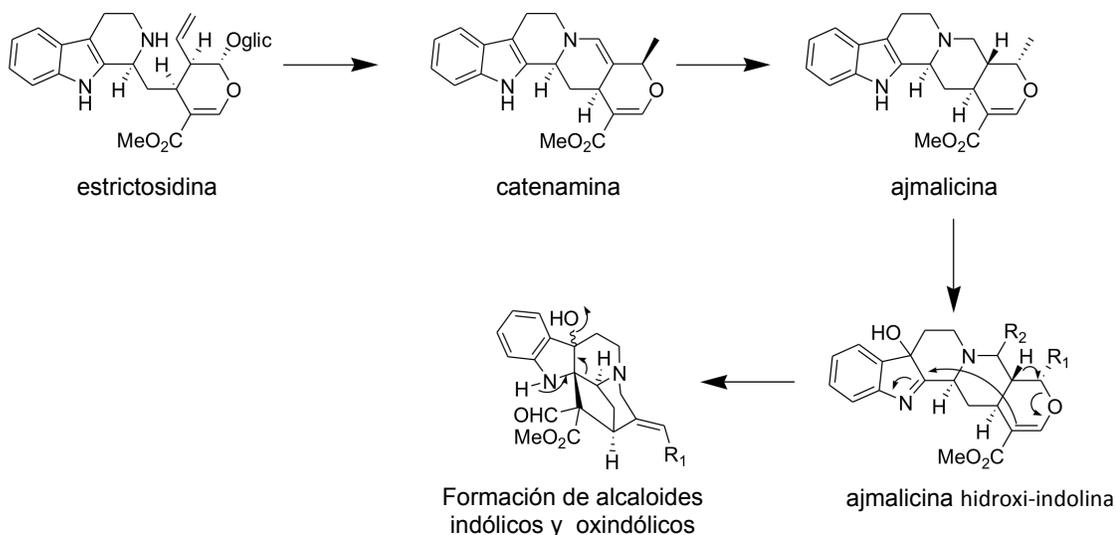


Figura 23. Propuesta de producción de alcaloides oxindólicos a partir de estrictosidina. Adaptada de Szabó (2008b).

Por otro lado Geerlings (1999), reportó que el color amarillo de la reacción catalizada por la SGD es debida a la producción de la 5,6-dehidroflavopereirina la cual es un producto de la 4,21-dehidrogeissoschizina. Este compuesto fue identificado por cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS) y por TLC. Estudios previos reportaron que hay un equilibrio entre la formación de catenamina y de la 4,21-dehidrogeissoschizina, dependiendo de la planta y el tipo de alcaloides que produzca, se favorecerá este equilibrio a alguno de los dos compuestos (Kan y Husson, 1980; O'Connor y Maresh, 2006). Bajo condiciones básicas el 4,21-dehidrogeissoschizina, puede formar 5,6-dihidroflavopereirina que es un compuesto aromático más estable de color amarillo (Fig. 24).

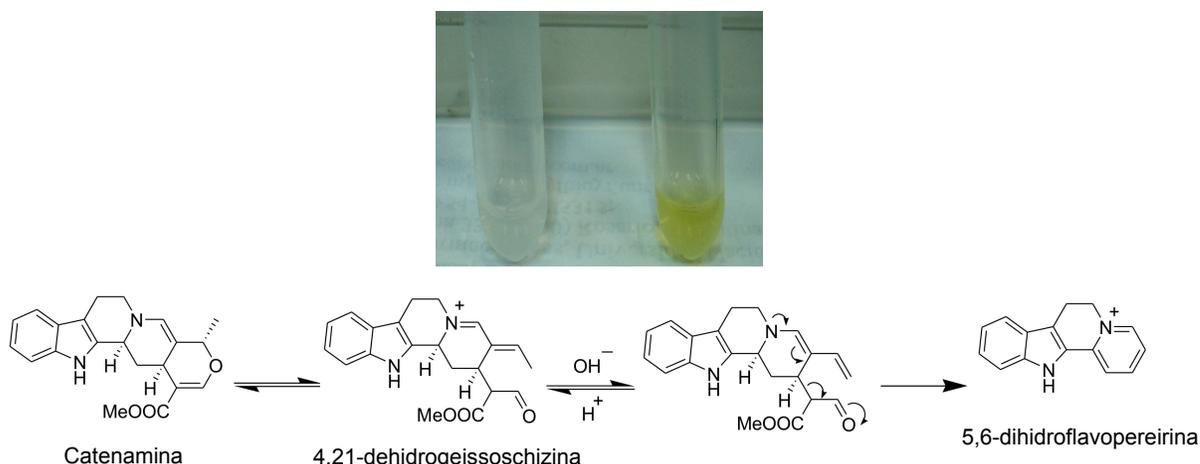


Figura 24. Propuesta del compuesto formación que da el pigmento de color amarillo durante la reacción de la SGD (Geerlings, 1999).

Para poder identificar los compuestos que pueden producir el color característico amarillo del producto, se llevó a cabo la reacción enzimática de la SGD descrita en materiales y métodos hasta parar la reacción por basificación. Con el fin de confirmar la 5,6-dihidroflavopereirina, se extrajo el producto de reacción con cloroformo. Posteriormente se realizó la separación en TLC utilizando como fase móvil n-butanol:ácido-acético:agua (4:1:1). Se obtuvo un producto con un R_f de 0.6 de color amarillo a una longitud de onda de 366 nm, características reportadas por Angenot *et al.* (1971) para la 5,6-dihidroflavopereirina (Fig. 25).

Bernhardt y colaboradores en 2007, atribuyen que el producto de color amarillo producto de la reacción catalizada por la SGD, se debe a la formación de aductos de triptamina, luego de un análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas (LC-HRMS), observaron que la formación de estos aductos oxidados forman el pigmento amarillo. Cabe señalar, que estos autores no encontraron las señales correspondientes a la 5,6-dehidroflavopereirina caracterizada por Geerlings (1999).

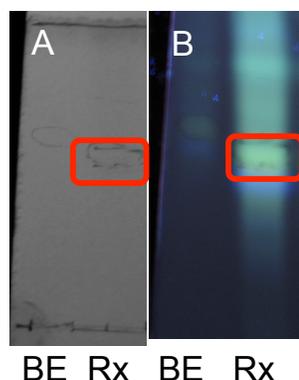


Figura 25. TLC identificación de 5,6-dihidroflavopereirina fase móvil n-butanol:ácido-acético:agua (4:1:1) $R_f = 0.6$; **A)** Placa de TLC a 264 nm **B)** Placa de TLC a 366 nm. BE, blanco enzima; Rx; reacción.

Por otro lado se analizó tanto el consumo de sustrato (estrictosidina) como la aparición de producto de la reacción enzimática de la SGD en placas de HPTLC. En esta placa utilizando como fase móvil CHCl_3 : MeOH (4:1), se identificó al sustrato estrictosidina por su R_f de 0.36 y su color característico marrón a una longitud de onda de 264 nm (Fig. 26A), en el caso del producto de reacción se identificó la catenamina con un R_f 0.42 su color característico amarillo a 366 nm (Fig. 26B) y color marrón a 264. En la figura 26, se puede notar que desaparece la estrictosidina y se observa la aparición de una banda con R_f mayor identificado como catenamina, lo que nos confirma que la reacción se está llevando a cabo mediante la transformación a partir de la estrictosidina.

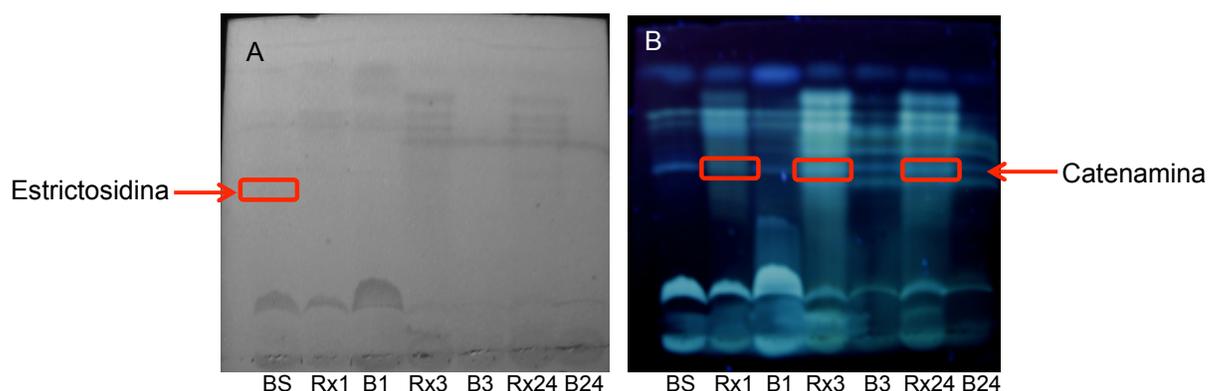


Figura 26. HPTLC de los productos de reacción de la SGD de *U. tomentosa*, fase móvil CHCl_3 : MeOH (4:1). **A)** Placa de HPTLC a 264 nm, se indica con cuadro rojo a la estrictosidina R_f 0.36 **B)** Placa de HPTLC a 366 nm; se indica con cuadro rojo a la catenamina R_f 0.46. BS, blanco de sustrato (solo estrictosidina); Rx1, Tiempo de reacción una hora; B1, blanco enzima tiempo 1 hora; Rx3, Tiempo de reacción de 3 horas; B3, blanco enzima tiempo tres horas; Rx24, Tiempo de reacción 24 horas; B24, blanco enzima tiempo 24 horas.

En la tabla 5 se encuentra un resumen de algunas características obtenidas para la estrictosidina β -glucosidasa de *U. tomentosa*.

Tabla 5. Características de la estrictosidina β -glucosidasa de *U. tomentosa*.

	SGD	Técnica utilizada
Masa Molecular KDa	60-63.32	SDS-PAGE/ Bioinformatica
pH óptimo	5-6.3	En amortiguador citrato y fosfatos
pI	5.6	Bioinformatica
K_m (nM)*	1.096	Método grafico Hanes- Wolf
V_{max} (nmol.min ⁻¹ mg ⁻¹)*	42.75	Método grafico Hanes- Wolf
Producto formación	Catenamina	TLC

*Sustrato estrictosidina

6.3 Clonación y caracterización del cDNA completo que codifica para *Ut_PSGD* de *U. tomentosa*

Para obtener el cDNA completo de la SGD de *U. tomentosa*, se seleccionó el material vegetal a utilizar. Se extrajo RNA con la técnica de Trizol (Invitrogen), de hojas, tallos y cultivos de raíces de *U. tomentosa*. En la figura 27 se observa que el

RNA extraído de las raíces presenta bajos rendimientos además de poca reproducibilidad en las repeticiones al extraerlo nuevamente. Por tal motivo para este experimento de clonación se decidió trabajar con hojas de plántulas.

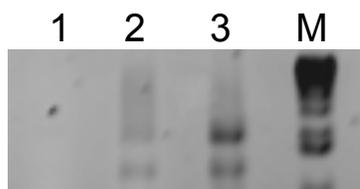


Figura 27. RNA total de *U. tomentosa* extraído con Trizol.1) raíz; 2) tallo; 3) hoja; M, Marcador 1Kb plus; gel de agarosa al 1.5%.

El primer paso para amplificar un fragmento correspondiente a la SGD de *U. tomentosa* mediante PCR, fue el diseñar cebadores por comparación de las secuencias conocidas de cDNA de la estrictosidina β -glucosidasa de: *C. roseus* (*Cr_SGD*), de *R. serpentina* (*Rs_SGD*) (Geerlings *et al.*, 2000; Gerasimenko *et al.*, 2002); y otras glucosidasas que participan en la biosíntesis de alcaloides como la raucaffricine β -glucosidasa (*Rs_RGD*) de *R. serpentina* (Warzecha *et al.*, 2000) y la Ipecac alcaloide β -D-glucosidasa (*Ipeglu1*) de *P. ipecacuana* (Nomura *et al.*, 2008), tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen de *SGD* de raíces de *U. tomentosa*.

Directo
AACTCTCTTCCACTGGGATSTTCCCAA
Inverso
TGTACCATATGGCTGAATCCTTTCGGTATCT

Para la obtención del gen de la SGD se utilizó la técnica RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) por lo que fue necesario obtener cDNA, a partir del RNA total, posteriormente se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados y una transcriptasa reversa. Los cebadores amplificaron un fragmento aproximado de 950 pb de conformidad con lo esperado con respecto a las secuencias de las cuales se diseñaron (Fig. 28).

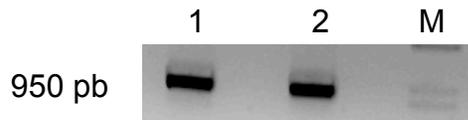


Figura 28. Producto de PCR en geles de agarosa 1.5% del gen *Ut_PSGD* de *U. tomentosa*. 1) Hoja; 2) Tallo; M, Marcador 1Kb plus.

El fragmento se purificó y clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega). Se transformaron bacterias *E. coli* JM109 con los productos de ligación, para posteriormente mandar a secuenciar los plásmidos. Se realizó un digestión con dos enzimas de restricción *SphI* y *PstI* (BioLabs®_{inc}), el resultado fue la liberación de 3 fragmentos uno de 3000 pb el cual pertenece al plásmido, otro banda de aproximadamente 650 pb y una más pequeña de 400 pb, lo cual nos indica que el fragmento fue digerido por estas enzimas ya que la suma de las bandas nos da el tamaño del fragmento esperado 950 pb (Fig. 29). En el carril 7 se observa otra banda además de las tres indicadas, la cual corresponde a un fragmento de aproximadamente 1000 pb, el cual pudo ocurrir debido a alguna de las enzimas de restricción reconoció otro sitio de corte y pudo liberar este fragmento.

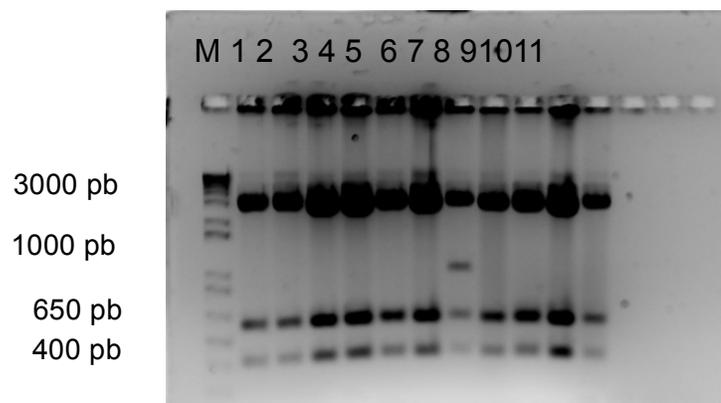


Figura 29. Digestión de plásmido pGEM-T Easy. Enzimas utilizadas *SphI* y *PstI*. M, Marcador 1Kb plus; 1-11, Plásmidos digerido.

De estos plásmidos se eligieron cuatro los de los carriles 1, 7, 8, 9 (Fig. 29), los cuales se amplificaron y purificaron para secuenciarlos por ambos extremos con los oligonucleótidos T7 y SP6. Los plásmidos purificados con un tamaño aproximado de

4000 pb se secuenciaron, en una concentración aproximada de 10 ng/μl (Fig. 30) por duplicado.



Figura 30. Plásmidos seleccionados que fueron purificados para secuenciar 1,7,8,9; M, Marcador 1Kb plus.

Las secuencias de los plásmidos se analizaron entre ellas para comprobar que la secuencia correspondiera en ambos sentidos. En la secuencia se encontraron los oligonucleótidos con los que se amplificó el fragmento, éste tiene una longitud de 922 pb (Tabla 7). La secuencia mostró una identidad del 68% con la *Rs_RGD*, un 61% con la *Cr_SGD* y la *Rs_SGD* (Warzecha *et al.*, 2000; Gerasimenko *et al.*, 2002); una identidad del 70% con la *Ipeglu1* siendo esta última la única planta perteneciente a la familia de las Rubiáceas (Nomura *et al.*, 2008). El análisis de la secuencia mostró dos sitios de corte para la enzima SphI, por lo que el fragmento liberado de 1000 pb observado en el carril 7 (Fig. 29) es debido al corte de la enzima.

Tabla 7. Secuencia de la *Ut_PSGD* de *U. tomentosa*. Fragmento obtenido de 922 pb, en gris se indican los cebadores utilizados.

Secuencia
AACTCTCTTCCACTGGGATGTTCCCAAGCATTGGAACTGAATACCTAGGGTTCTTAAGCGA GAAATCCGTGGAGGATTTTGTGGACTATGCAGATCTTTGCTTTAGAGAATTTGGTGATAGAGT AAAGTACTGGATGACATTCAATGAGACATGGAGCTATAGTTTGTGGATACCTGTTAGGCAC TTTTGCTCCTGGCCGAGGTAGCACTAATGAAGAGCAAAGGAAAGCAATAGCCGAAGACCTCC CATCAAGTCTAGGAAAGTCGAGGCAAGCATTTGCACATAGTCGTACACCAAGAGCTGGTAAC CCATCCACTGAACCATATATTGTGACACACAACCAGCTTCTTGCTCATGCAGCTGCAGTAAAG TTATACAGATTTGCATATCAGAATGCTCAAAGGGTAAAATCGGGATTGGACTTGTTAGCATT GGGCTGAACCGCACAAATGATACAACAGAGGACAGAGATGCTGCACAACGAGTGCTTGACTTC ATGCTTGGATGGTTATTTGATCCCGTGGTCTTCGGCAGGTATCCTGAGAGCATGAGAAGGCTT TTAGGAAATCGACTTCCGGAGTTCAAACCAACCAACTTAGAGACATGATTGGGTCATTTGAT TTTATTGGGATGAACTATTACACTACCAATAGTGTAGCCAACCTCCCATATTCAAGATCCATCA TATATAATCCAGATTCTCAGGCTATATGTTACCCTATGGGCGAGGAGGCAGGCTCTTCTTGGG TTTATATTTATCCTGAGGGATTGCTGAACTGTTGCTCTATGTAAGGAGAAGTACAATAATCC CCTTATCTACATCACGAAAATGGGATTGATGAGGTAATGATGAGAATTTGACCATGTGGGA AGCTCTTAAAGATATCCAAAGGATTCAGCCATATGGTACA

6.3.1 Amplificación del cDNA completo de la *Ut_PSGD*

Con la secuencia obtenida de 922 pb se diseñó otro par de oligonucleótidos. El diseño de éstos se realizó de tal forma, para que, al momento de amplificar el gen por ambos extremos 5' y 3' se identifique el fragmento completo de la secuencia de 922 pb (Fig. 31).

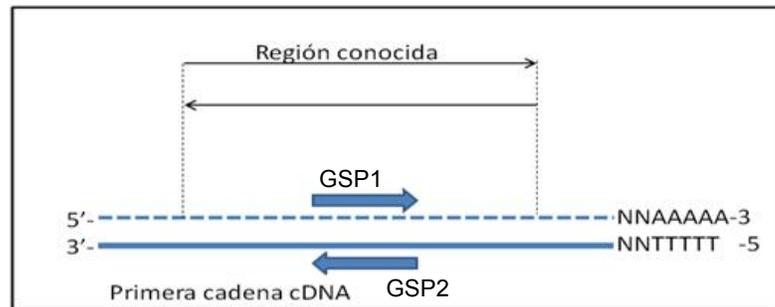


Figura 31. Diagrama de la posición de los oligonucleótidos diseñados.

Para realizar este experimento se utilizó el kit SMARTTM RACE cDNA Amplification de Clontech. El método se basa en amplificar cDNA a partir de RNA total, utilizando un cebador específico para una región interna cercana al comienzo del gen de estudio. Este cebador se une al mRNA del gen y dirige la primera etapa del proceso catalizada por una transcriptasa reversa, durante el cual se fabrica un cDNA correspondiente al comienzo del mRNA. Una vez fabricado el cDNA, se une una cola de cola de poli (A) a su extremo 3'. Un segundo cebador se hibrida con esta secuencia de poli(A) y durante el primer ciclo de la PCR normal, convierte el cDNA de una sola cadena en una molécula de doble cadena, que después se amplifica a medida que prosigue la PCR (Fig. 32). Una vez obtenido el DNA se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para amplificar por separado los extremos del gen en cuestión. Por último se hace una mezcla con ambos oligonucleótidos (5' y 3') para obtener el gen completo.

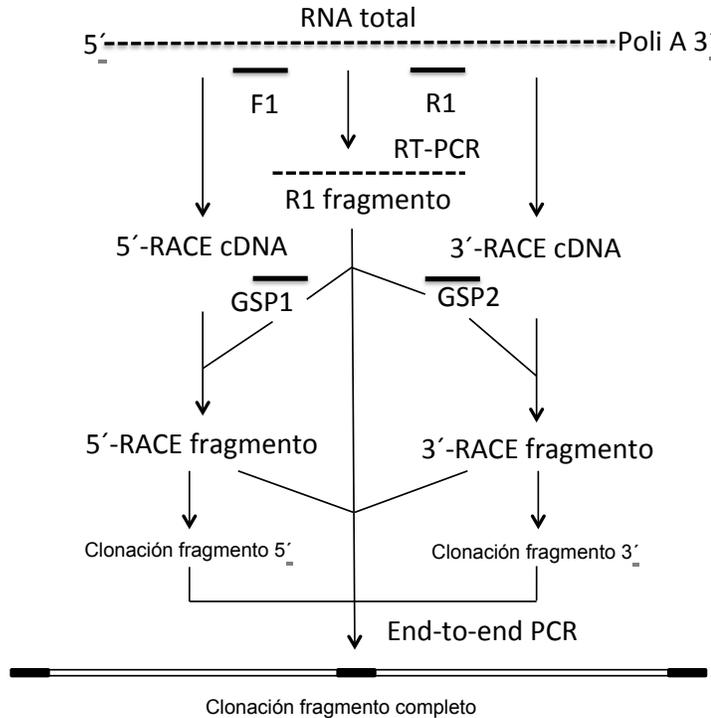


Figura 32. Diagrama de la obtención cDNA completo de la *SGD* por PCR. F1, oligonucleótido sentido degenerado; R1, oligonucleótido reverso degenerado; GSP1, oligonucleótido sentido específico para el gen; GSP2, oligonucleótido reverso específico para el gen. RACE, rápida amplificación de cDNA por extremos terminales.

Para realizar la técnica del RACE se obtuvo RNA de hojas de plántulas. Se prosiguió a amplificar los extremos 5' y 3' por separado, en donde se observaron bandas con el tamaño esperado de aproximadamente de 1000 pb. El tamaño esperado para el amplificado de la secuencia completa era de 2000 pb (Fig. 33). En la figura 34 se muestran los fragmentos clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) que se enviaron a secuenciar.

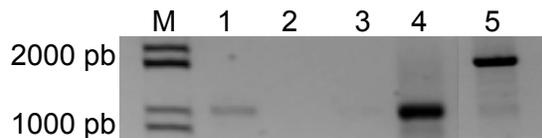


Figura 33. Amplificación de fragmentos SGD *U. tomentosa*. M, Marcador 1Kb plus; 1, Extremo 5' del gen; 2-4, Controles negativos de la reacción; 4, Extremo 3' del gen; 5, Secuencia completa (5-3).

El cDNA completo clonado de la *Ut_PSGD* se analizó mediante el programa ORF Finder (NCBI). Dentro de los resultados obtenidos se encontró que la secuencia

contiene un marco abierto de lectura de 1662 pb. Como se muestra en la figura 35, todos los oligonucleótidos utilizados en la PCR se encuentran en el ORF. Asumiendo que el codón de inicio es ATG, la posición 124 representa el codón de inicio, el ORF codifica para 533 residuos de aminoácidos, con una masa molecular teórica de 63.32 KDa y un pI de 5.76.

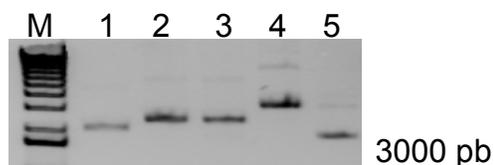


Figura 34. Plásmidos con inserto técnica RACE en *U. tomentosa*. M, marcador 1 Kb plus; 1, control Positivo; 2, Extremo 5' del gen; 3, Extremo 3' del gen; 4, Secuencia completa del gen (5-3); 5, Plásmido sin inserto.

La secuencia de aminoácidos de la supuesta estrictosidina β -glucosidasa de *U. tomentosa* (*Ut_PSGD*) mostró una alta homología con glucosidasas de otras plantas. La *Ut_PSGD* tuvo un 60% de identidad con β -glucosidasas de diferentes plantas como: *Arabidopsis lyrata* (ARALYDRAFT_493685; RA Hu *et al.*, 2011); *Ricinus communis* (B9RI71; Chan *et al.*, 2010); *Lotus japonicus* (ACD65509.2; Morant *et al.*, 2008); *Consolida orientalis* (AEB61485.1; Dick *et al.*, 2010); *Arabidopsis thaliana* (BAC42451; Seki *et al.*, 2002); un 75% de identidad con la raucaffricine β -glucosidasa, *Rs_RGD* (AF149311; Warzecha *et al.*, 2000) un 42% de identidad con la estrictosidina β -glucosidasa de *Catharanthus roseus*, *Cr_SGD* (Q9M7N7; Geerlings *et al.*, 2000); un 78% con la supuesta estrictosidina β -glucosidasa de *Cyanea acuminata*, *Ca_PGd* (JF508379; Sun *et al.*, 2011), un 80% con la secuencia parcial de una β -glucosidasa reportada para *Mitragyna speciosa* (H9MZK3; Seetang-Nun *et al.*, 2011).

Cabe destacar que la estructura primaria contiene dominios conservados en la familia 1 de las glicosil hidrolasas permite clasificar la *Ut_pSGD* dentro de esta familia. Estas regiones conservadas se encuentran en las posiciones 47-61 y de la 412-419, siendo esta última posición la que contiene el sitio catalítico nucleófilo (ácido glutámico) el cual normalmente es seguido una asparagina como es el caso

de la *Ut_PSGD*, la *Rs_RGD* y la *Ipeglu1*. Sin embargo en la *Cr_SGD* es seguido de un cisteína y en la *Rs_SGD* por una serina (Fig. 36). Las secuencias conservadas de la familia 1 de las glicosil hidrolasas están marcadas con los cuadros, las secuencias involucradas en el reconocimiento de la formación del aglicón en la *Rs_SGD*, están marcados con triángulos negros. En la *Rs_SGD* se ha observado que el Trp-388 es de gran importancia en la identificación de la formación del aglicón, el cual de un espacio más amplio en el sitio catalítico, lo cual permite acomodar sustratos más grandes con respecto a otras β -glucosidasas (Barleben, *et al.*, 2005).

```

                                aagcagtggtatcaacgcagagtacgcgggggc
acagcacattagcaatttttatcgtttcaattagtaataataaaaaa
124 agcctagtgaaagtgagggtgaaatcctccacgagaaacaaaatc
M S T P A T K F S G T V S R S
169 atgtcaactccagctactaagttttcaggaaccgtctccccgagc
D F P E G F L F G S A S S A F
214 gacttcccagagggttttctctttgggtctgcttcatccgccttt
O Y E G A H N V D G R L P S I
259 tgggatactttcctggtgaaacccaccctgatatagtagccgca
W D T F L V E T H P D I V A A
304 aatggattggatgcagttgaattttactacagatataaggaggac
N G L D A V E F Y Y R Y K E D
349 ataaaagccatgaaggacataggacttgacactttcagattctcc
I K A M K D I G L D T F R F S
394 ctctcgtggccgagaatccttacccaatggaagaagaactaggggg
L S W P R I L P N G R R T R G
439 ccaaacaatgaagagcaaggagtgaataagttggccatagatttc
P N N E E Q G V N K L A I D F
484 tataataaagtcattaacttgctcctggagaatggtatagagcct
Y N K V I N L LL E N G I E P
529 agtgtgactctctccactgggatgttcccccaagcattggaaaat
S V T L T H W D V P Q A L E T
574 gaatacctagggttcttaagcgagaaatccgtggaggattttgtg
E Y L G F L S E K S V E D F V
619 gactatgcagatctttgcttttagagaatttgggtgatagagtaaag
D Y A D L C F R E F G D R V K
664 tactggatgacattcaatgagacatggagctatagtttgttggga
Y W M T F N E T W S Y S L F G
709 tacctgttaggcacttttctcctggccgaggtagcactaatgaa
Y L L G T F A P G R G S T N E
754 gagcaaaagaaagcaaatagccgaagacctcccatcaagtctagga
E Q R K A I A E D L P S S L G
799 aagtcgaggcaagcatttgcacatagctgtacaccaagagctggt
K S R Q A F A H S R T P R A G
844 gaccatccactgaaccatataattgtgacacacaaccagcttctt
D P S T E P Y I V T H N Q L L
889 gctcatgcagctgcagtaaagttatacagatttgcataatcagaat
A H A AA V K L Y R F A Y Q N
934 gctcagaatgctcaaaagggttaaaatcgggattggactgttagc
A Q N A Q K G K I G I G L V S
979 atttggcgtgaaccgcacaatgatacaaacagaggacagagatgct
I W A E F H N D I T I E D R D A
1024 gcacaacgagtgcttgacttcatgcttggatggttattttgatccc
A Q R V L D F M L G W L F D P
1069 gtggcttccggcaggtatcctgagagcatgagaaggcttttagga
V V F G R Y P E S M R R L L G
1114 aatcgacttccggagttcaaacacaccaacttagagacatgatt
N R L L P E F K P H Q L R D M I
1159 gggtcatttgattttattgggatgaactattacactaccaatagt
G S F D F I G M N Y Y T TT2NS
1204 gtagccaacctcccatattcaagatccatcatatataatccagat
V A N L P Y S R S I I Y N P D
1249 tctcaggctatatgttaccctatgggagaggaggcaggctcttct
S Q A I C Y P M G E E A G S S
1294 tgggtttatatttctcctgagggattgctgaaactgttgctctat
W V Y I Y P E G L L K L LL Y
1339 gtaaaggagaagtacaataatcccccttatctacatcacggaaaat
V K E K Y N N P L I Y I T E N
1384 gggattgatgaggtaaatgatgagaatttgaccatgtgggaagct
G I D E V N D E N L T M W E A
1429 ctttatgatacccaaaggatatcctaccacaagcaacatcttgaa
L Y D T O R I S Y H K Q H L E
1474 gccaccaaacaggctatctcacaaggagtcgatgtgagaggggtac
A T K Q A I S Q G V D V R G Y
1519 tacgcatggctggttacggacaatttagaatgggcttcgggtttt
Y A W S F T D N L E W A S G F
1564 gattctcgtttggtttgaactacgtgcatttttgtagaaaaattg
D S R F G L N Y V H F G R K L
1609 gagaggatccaaaactatctgctggctgggttcaagttcttctcctc
E R Y P K L S A G W F K F F L
1654 gaaaatggaaagtcagcaagtttctgctggagcattattggaaat
E N G K S A S F C W S I I G N
1699 aacatatgcctaaataaaaggagtcgggtgtacccttgtggattgt
N I C L N K R S R C T L V D C
1744 cgcatttatattcttttagttataagaatctatgtatgtaa 1785
R I Y I L L V I R I Y V C *
taaggaaggtgaggttcagtcctcaccctgagaacttttaattgt
gttgccgagttaatggtctggttccgaacagactattatatttaa
agctgaatggtttgatgtagattgccactgttgattgtttgct
tgatatcttaactttaatttggcttgatatcttaatnttaatttta
atcgtggcattaatcaatatctataacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaagtactctgcttgataccactgcttgcctatagtgga
gtcgtattaga

```

Figura 35. Secuencia de nucleótidos (2538 pb) y secuencia de aminoácidos (533 aminoácidos) del cDNA completo que codifica para una supuesta estrictosidina β-glucosidasa de *Uncaria tomentosa*. Los aminoácidos subrayados indican los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones (R1-F2 para la obtención de un fragmento cDNA; GSP1-GSP2, utilizados en la técnica RACE). El codón de paro se indica con un asterisco (*).

```

Cr_SGD  MGSKDDQSLVVAISPAEAPNGNHSVPIPPAYPSIPTQERKHNKPIVHRRDFPSDFLFCAG
Rs_SGD  MDNTQAEPLVVAIVPKPNASTEHTN-----SHLLEPVTRSKIVVHRRDFPQDFLFCAG
Rs_RGD  -----MATQSSAVIDSNDAIRISRSDFPAPDFLFCAG
Ipeglu5 -----MSSVLPTEVLPPTPGRNINRGHFPDDFLFCAG
Ca_PSGD -----MEAQSLPESLVHNPSSIVHRRDFPQDFLFCAG
Ut_PSGD -----MSTPATKFSGTVSRSDFFPEGFLFCAG

Cr_SGD  GSAYOCEGAMNEGNRGPSTIWDFTFNRYPAKIA DGSNGNOAINSYNLYKEDIKIMKQVGLG
Rs_SGD  GSAYOCEGAMNEGNRGPSTIWDFTFNRS PAKIS DGSNGNOAINCYHYLYKEDIKIMKQVGLG
Rs_RGD  SSAYOIEGAGRDGGRGPIWDFTFTHRRPDMIRGCTNGDVAVDSYHLYKEDVNLKLNGLD
Ipeglu5 TSSYOIEGAAREGGRGPIWDFTFTHPELIDGNSGDTAINSYNLYKEDIKIMKQVGLD
Ca_PSGD SAAYOIEGAANEYGRGPIWDFTFTHRHGKMGVDCSNGNVADSYHREKEDIKIMKQVGLD
Ut_PSGD SSAFOYEGAHNVDRGLPSTIWDFTFLVETHPDIVAAAN-GLDAVEFYRYKEDIKIMKQVGLD

Cr_SGD  SYRFSISWSRVLPGGNLSGG-----VNKDGVKFYHDFIDELLANGIKPFAVTLFHWDLF
Rs_SGD  SYRFSISWSRVLPGGRLAAG-----VNKDGVKFYHDFIDELLANGIKPFAVTLFHWDLF
Rs_RGD  AYRFSISWSRVLPGGRLSGG-----VNKEGIVNYNLLIDGLLANGIKPFAVTLFHWDLF
Ipeglu5 AYRFSISWRILPGGNINAG-----INQEGIKYNNLLIDELLANDIHPVYVTLFHWDLF
Ca_PSGD AYRFSISWSRLPSSGKLSGG-----VNKEGVNFYNDFIDELVANGIEPFAVTLFHWDLF
Ut_PSGD TFRFSLSWRILPGRRTFRGPNNNEEQGVNKLALDFYKNVINLLENGIEPFAVTLFHWDLF

Cr_SGD  QALEDEYGGFLSDRIVEDFTEYAEFCFWEFGDKVKNWTFNNEHTFYV-ASGYALGEFAPG
Rs_SGD  QALEDEYGGFLSHRIVDDFCYEAFCFWEFGDKIKYWTFNNEHTFA-VNGYALGEFAPG
Rs_RGD  QALEDEYGGFLSDRIVDDFCYEAELCFWEFGDRVKHNTLNELWTFV-VHGYALGLYAPG
Ipeglu5 QALQDQYDGFGLSDRIVDDFRDFAELCFWEFGDRVKNWTFINEIESYNNFFGVAYDFFPKA
Ca_PSGD QALENEYGGFLSPRITADYVDFAEELCFWEFGDRVKNWTFCNEIWTYV-VSGYVGLGFFAPG
Ut_PSGD QALETEYGLFELSEKSVDEFDYADLFCREFGDRVKNWTFNNEHSYS-LEGYVGLGFFAPG

Cr_SGD  RG-----GADGKGEFGKEPYIATHNLLLSHKAAVEVY
Rs_SGD  RG-----GKGDEGPAIEPYVVTNHNILLAHKAAVEEY
Rs_RGD  RGRFTEPEHVNHPTVOHRCST---VAPQCICSTG--NPGTEPYVVTNHNLLAHAAVAELY
Ipeglu5 HALKASRLLVPTVVARPSKP---VRVFASTADFGTTADQVVKVGHNLLAHAAALQVY
Ca_PSGD RGPSSREFTMRSLPALCRR---SILHTHICTDGNPATEPYRVVHLLLSHAAVAEKEY
Ut_PSGD RGSFNEEQRKAIAEDLPSLGGKSRQAFASRTPRAGDPSTEPYIVTNNOLLAHAAAVKLY

Cr_SGD  RKNFQKCO---GGEIGIVLNSMWMEPLN-ETKEIDIDARERGLDFMLGWFIPLTTGTYPK
Rs_SGD  RNKFQKCO---EGEIGIVLNSMWMEPLS-DVQADIDAQKRALDFMLGWFLLEPLTTGTYPK
Rs_RGD  KKNFORGO---EGQIGISHATQWMEPWDENSASDVEAAARALDFMLGWFEPLTTGTYPK
Ipeglu5 RDKFQNTQ---EGFFGMALVTVQWKKPLNENNPADVEAASRAFDKFGWFMOPPLITGTYPK
Ca_PSGD RTKQNTCO---RGMIGIVLNVTVNPEPSEWCNDRKKAERGLDFMLGWFLPEVINGTYPO
Ut_PSGD RFAYQNAQNAQKKGKIGISLVSIWAEPHN-DTEEDRDAARVLDVDFMLGWFLDFPVVFSRYPE

Cr_SGD  SMRDLVGRRLPEFSTEVESEKLTGQYDFIGMNYTTTYVSNADKI-P-DTPGYETDARINK
Rs_SGD  SMRDLVKGRLPKFSADDSSEKLGQYDFIGMNYTTATYVFNNAVKS-NSEKLSYETDDQVTK
Rs_RGD  SMKKFVGRRLPKFSPEQSKMLKGSYDFVGLNYTASVYFNASTN-SSGSSNNPSYNDTHV
Ipeglu5 SMRDLGRLPEFTEPDQKLLIGSYDYVGVNYTATYVSSAQP--PHDKKKAVFHDGTF
Ca_PSGD SMQNLVKORLPEFSEEBESKLLKGSDFDFIGMNYTASNAYAKDAPQAGSDGKLSYNTDSKVEI
Ut_PSGD SMRRLDGNRLPEFTEPQLRDMIGSDFDFIGMNYTTNSVANLPSY---RSIITVNPDSQAIC

Cr_SGD  NIFVKVVDCKEVRIGCEPCYGGWOHVVPSCLYNLLVYTKKEYVVPVTVYVSECGVVEENRTN
Rs_SGD  ---TFERNOKPIGHALYGGWOHVVPNGLYKLLVYTKKEYVVPVTVYVTEGCVVEEN---
Rs_RGD  T---YETDRNGVPIGPPQSGDWLLIYBEGIRKFLVYTKKEYVNPVLYVTEGVVDDV---
Ipeglu5 Y---TDSKDCVIFCLACPAWLNIVPEGIYHVLQDIKENYEDPVYITENGVEVM---
Ca_PSGD H---HERKKDVPICPLGGSNIVYLYPEGIYRLLDWMRKKYNNPLVYITENGVDKRN---
Ut_PSGD Y---PMGEEAGSSVYIYIYPEGLLKLKLLYVKEKYNPLIYITENGIDEVN---

Cr_SGD  ILLTEGKTNILLTEARHDKLRVDFLOSHLASVRDAIDDGVNKGFVWVSFFDNFENWLG
Rs_SGD  -----KTKILLSEARRDAERTDYHOKHLASVRDAIDDGVNKGFVWVSFFDNFENWLG
Rs_RGD  -----NNTLTLSEARKDSMRLEKVLQDHLFNFVROAMNDGVNKGKFAWSLIDNFENWEGY
Ipeglu5 -----DTAKTLSEARVDTRLEHMLQDHLKLVLEARHCGVRVQGYLWVSLMDNFWELRAGY
Ca_PSGD -----DRLTLSEARHDETRRDYHEKHLRFLHYATHEGANVKGYFAWSFMDNFENWSEGY
Ut_PSGD -----DENLTMWEALYDTRISYHKOHLAATKQATSGQVDRVRYVAWSFMDNFWELWASGF

Cr_SGD  ICRVGLIHDYKTFORYPKDSAIWYKNFISEGFVNTAKKRFREEDKLVVVKKOKY--
Rs_SGD  ICRVGLIHDYKSFERYPKESAIWYKNFIAGRSTTSFAKR--RREAOQVETVKKRQKT--
Rs_RGD  GVRFGIHDYNDNFARYPKDSAVWLMNSFHKNSKLPKAKRSTREDEEQQVSSKRDK-
Ipeglu5 TSRFGLIHDYNNFARYPKDSAIWYKNFIFLTKTEKTKKROLDHKELDNIPQK---
Ca_PSGD SVRFGLIHDYKNDLARYPKDSAIWYKNFLLTKTEKTKKROLDHKELDNIPQK---
Ut_PSGD DSRFGLNHYVHFRKLERYPKLSAGWFKFELNCKSASFCWSIIGNNICLNKRSRCTIYDC

Cr_SGD  -----
Rs_SGD  -----
Rs_RGD  -----
Ipeglu5 -----
Ca_PSGD -----
Ut_PSGD RIYILLVIRIYVC

```

Figura 36. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la SGD de *Uncaria tomentosa* (Ut_PSGD, nº de acceso, JQ3666085) con secuencias de aminoácidos de otras plantas, *Catharanthus roseus* (Cr_SGD, nº. de acceso, Q9M7N7); *Rauvolfia serpentina*, (Rs_SGD, nº. de acceso, Q8GU20); *Rauvolfia serpentina*, rauciffricine β-glucosidasa (Rs_RGD, nº. de acceso, Q9SPP9); *Psychotria ipecacuana*, β-glucosidasa (Ipeglu1, nº de acceso, B6ZKM7); *Camptotheca acuminata*, supuesta SGD (Ca_PSGD, nº de acceso, JF508379).

La localización subcelular de la *Ut_PSGD* se predijo utilizando los programas SignalP versión 4.0 (Nordahl *et al.*, 2011) y TargetP versión 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000), ambos programas predijeron la ausencia de péptidos señal. La enzima Cr_SGD fue localizada por Geerlings (1999) asociada a membrana en el retículo endoplásmico. Sin embargo Guirimand y colaboradores (2010b), confirmaron la localización de la Cr_SGD, la cual tiene péptidos señal de localización cercanos al núcleo en el extremo C-terminal (514-AKRRREEAQ-VEL**VKRQKT**-532), al igual que la Rs_RGD (521-V**KRS**IREDDDEEQVSS**SKRLRK**-540). Algunos de estos péptidos señal se encuentran también en la secuencia de la *Ut_PSGD* en algunos casos con residuos de aminoácidos similares (RS**R**CTLVDCRIYLL**VIRIYV**). Las secuencias se encuentran marcadas en la figura 36 con cuadros punteados. En nuestro caso en vez de tener lisina se encuentra arginina en los primeros aminoácidos, sin embargo en la secuencia final sólo encontramos dos aminoácidos con las mismas características valina y arginina. Guirimand y colaboradores (2010a) reportaron que la localización de la enzima está relacionada con la regulación de la biosíntesis de AIT, mediante la compartimentalización de sustratos. De tal manera propusieron un modelo en el cual la estrictosidina se encuentra secuestrada en la vacuola, la cual es transportada cerca del núcleo para ser hidrolizada por la SGD, que implicaría un complejo sistema de transporte a través del tonoplasto. Estos autores también presentan un modelo interesante de activación de la estrictosidina en respuesta al ataque de patógenos. Por lo anterior y dada la importancia de la regulación de la activación de AIT mediante un flujo metabólico, es necesario realizar estudios específicos en *U. tomentosa* para saber la localización intracelular de esta enzima.

Para obtener más información de la SGD, se modeló la estructura de la *Ut_PSGD* en 3D utilizando el programa Swissmodel (Guex, y Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006), que se basa en el modelado de las enzimas con respecto a estructuras previamente cristalizadas, en nuestro caso se utilizó como molde la estructura de la *Rs_SGD* (Barleben *et al.*, 2005). La *Rs_SGD* presenta la estructura características de Tim-Barril de las glicosil hidrolasas (Barleben *et al.*, 2005) la estructura consiste el 13 α -hélices y 13 cadenas- β , las cuales forman la estructura

Tim-barril, esta estructura tiene una cavidad que contiene el sitio de unión para el sustrato. En la figura 37 se observa la estructura 3D de la *Ut_PSGD*. Dentro de los parámetros que utiliza el SWISS-Model se encuentra el QMEAN4, el cual es una calificación de fiabilidad para todo el modelo y que se puede utilizar con el fin de comparar y clasificar los modelos alternativos de un mismo objetivo. La estimación de la calidad varía entre 0 y 1, con valores más altos para los mejores modelos. En el caso de la *Ut_PSGD* se obtuvo un QMEAN4 de 0.52, el cual es un valor aceptable.

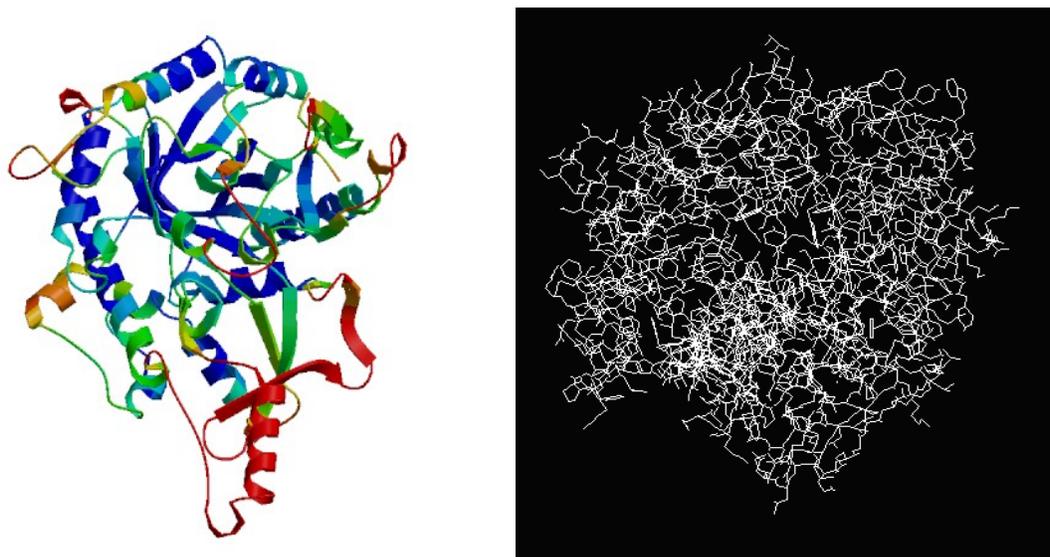


Figura 37. Estructura en 3D de la strictosidina β -glucosidasa de *Uncaria tomentosa* (*Ut_PSGD*).

Con el fin de determinar la distancia evolutiva entre las diferentes *SGD* se construyó un árbol filogenético. La construcción del árbol filogenético se llevó a cabo con el programa MEGA 5.5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). El árbol se construyó con base en el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), utilizando la secuencia de nucleótidos de las enzimas (Fig. 38). El resultado mostró que la *SGD* y otras enzimas involucradas en la biosíntesis de alcaloides en *C. roseus*, *R. serpentina*, *P. Ipecacuana*, *C. acuminata* y *U. tomentosa* se encuentran en el mismo grupo, mientras que las glicosil hidrolasas que no están involucradas en el metabolismo secundario se agruparon en otro diferente incluyendo a las de *A. lyrata*, *A. thaliana*, *C. orientalis*, *R. communis*, *Glycine max*, *L. japonicus*. Esto nos habla de que todas los *SGD* evolucionaron a partir de un ancestro común, basado en regiones

conservadas que le van a dar características estructurales similares, tales como homologías de aminoácidos y dominios conservados.

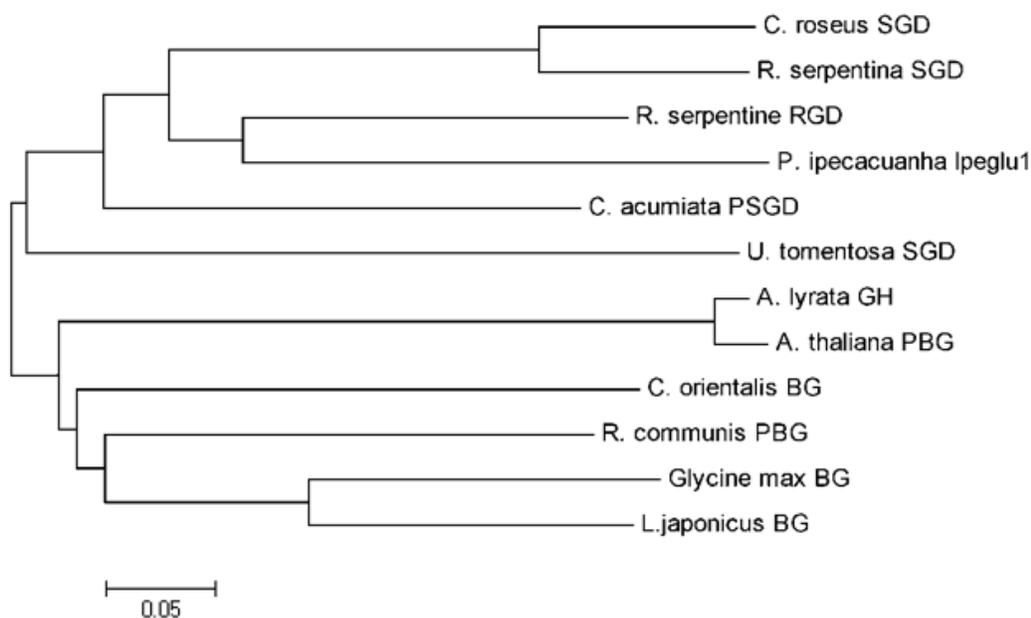


Figura 38. Árbol filogenético análisis de Ut_PSGD de *U. tomentosa* con *C. rosues* (AF112888.1), *R. serpentina* (AF149311.1), *R. serpentina* (AJ302044), *P. ipecacuana* (AB455580.1), *C. acuminata* (AES93119), *A. lyrata* (GL348715.1), *A. thaliana* (NP_200268), *C. orientalis* (HM559226.1), *R. communis* (EQ974044.1), *Glycine max* (AB259819.1), *L. japonicus* (EU710844.2).

6.3.2 Distribución de la actividad de SGD en diferentes tejidos de *U. tomentosa*.

Estudios previos en *U. tomentosa* demostraron que la biosíntesis de los AOM proviene vía estrictosidina (Ramos-Valdivia y Cerda-García, 2007). Por lo que se espera que la actividad de la siguiente enzima después de la estrictosidina β -glucosidasa participe en la biosíntesis de los alcaloides indolterpénicos. La actividad de la SGD fue medida en extractos protéicos en diferentes tejidos como hojas y tallos de plántulas (de tres y seis meses), células en suspensión y cultivo de raíces de *U. tomentosa*. La distribución de la actividad enzimática de la SGD fue mayor en la parte aérea de la plántulas teniendo la menor actividad los tallos (Tabla 8). Estos resultados se correlacionan con la acumulación del transcrito tanto en el tejido como en los cultivos, teniendo mayor cantidad de transcritos de la SGD en hojas de plántulas jóvenes (Tabla 8).

Tabla 8. Actividades enzimáticas de la SGD en diferentes extractos de proteína y expresión del RNAm *Ut_PSGD* en *U. tomentosa*.

	Tallo	Hoja	Raíz	Cultivo Raíces	Células suspensión
Actividad SGD (pkat/mg)	118.12	480.97	219	236	208
Expresión SGD mRNA	+	+++	n.d.*	++	n.d.*
					

n.d. No determinado

Por otro lado, se observó que la actividad de la SGD disminuía en hojas de plántulas de 6 meses de edad, mostrando una actividad 8.5 veces menor (56.53 pkat/mg) con respecto a la actividad de las hojas de plántulas de 3 meses de edad. Esta característica, también ha sido descrita en la actividad de la STR que ocurrió en hojas de plántulas de seis meses de edad y tallos de *Cinchona* (Aerts *et al.*, 1991). En otras plantas como *O. pumila* y *C. acuminata* la distribución de la actividad de la STR en los diferentes tejidos de la planta, se ha correlacionado con el nivel de transcritos y la producción de alcaloides, siendo los tallos y las raíces los de mayor actividad (Yamazaki *et al.*, 2003). Nuestros datos demuestran una correlación positiva entre el contenido de AOM en los diferentes tejidos y las enzimas involucradas en la biosíntesis de estos compuestos, indicando que los AOM están principalmente almacenados en la parte aérea de las plantas en hojas jóvenes (Luna-Palencia *et al.*, 2013).

6.4 Perfil proteómico de raíces de *U. tomentosa* elicidadas con BSO-JA.

En el metabolismo secundario, muchas enzimas están involucradas tanto en la traducción de señales, como en el transporte y en la regulación de la producción de estos compuestos. Los primeros estudios de biosíntesis de estos metabolitos consistían en utilizar isótopo radiactivo seguido del aislamiento y caracterización estructural de los compuestos marcados con el objetivo de encontrar la enzima capaz de realizar los posibles pasos biosintéticos. Diferentes autores han clonado con éxito diferentes enzimas de la biosíntesis de alcaloides (Hashimoto y Yamada, 2003; Bernhardt *et al.*, 2007; Stöckigt *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Sin embargo, el aislamiento y caracterización bioquímica de las enzimas mediante purificación para su posterior secuenciamiento consume tiempo, es puntual al analizar cada enzima por separado. Por lo que, el enfoque proteómico es considerado que consume un menor tiempo y es más completo al permitir identificar diferentes enzimas con el mismo proceso, ya sean estas enzimas del metabolismo primario o secundario, como proteínas de transporte o aquellas involucradas en su regulación.

El análisis del proteoma presenta muchos retos metodológicos ya que consiste en analizar proteínas de diferentes compartimentos intracelulares que pueden presentar diferencias en cuanto a su solubilidad. Por lo anterior, la preparación de la muestra es uno de los pasos cruciales en la separación de proteínas mediante electroforesis, en 2D en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se han descrito diferentes procedimientos de preparación y solubilización de proteínas; el método más eficiente es una mezcla de agentes caotrópicos, detergentes y agentes reductores (Leimgruber *et al.*, 2002; Tastet *et al.*, 2003; Jacobs, 2003). El primer intento de extracción de proteínas de raíces de *U. tomentosa* fue utilizando un amortiguador comercial de BioRad (Rehydration buffer) el cual contiene: urea (8 M), CHAPS (2 %) y ditiotreitól (DTT, 50mM). Además y de acuerdo a la bibliografía consultada para extractos vegetales (Jacobs, 2003) se adicionó al amortiguador una concentración final de 2 M de tiourea. Los resultados son presentados en la figura 39, en donde se observa, que luego de la electroforesis en una dimensión con los dos amortiguadores de extracción, el amortiguador adicionado con thiourea permitió

disolver un mayor número proteínas, con respecto al amortiguador que no lo contenía.



Figura 39. Comparación del patrón electroforético en geles (SDS-PAGE) al 12 %, de extractos de raíces de *U. tomentosa*. 1) Utilizando con un amortiguador comercial (Rehydration buffer); 2) El amortiguador comercial adicionado con 2M de tiourea; M, marcador.

Superada la fase de extracción se estandarizó la cantidad de biomasa a utilizar, para poder obtener la cantidad de proteína necesaria por micro litro, que en este caso de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (BioRad) para tiras de isoelectroenfoque de 11 cm, sería de 200 μ g en 200 μ l. Por lo que para poder obtener esta cantidad de proteína se partió de 10 g de biomasa. Teniendo la cantidad de proteína necesaria se prosiguió a realizar el isoelectroenfoque, en un primer intento, se utilizó el programa base en el equipo para tiras de 11 cm que tiene 3 pasos, en los cuales el voltaje sube de la siguiente manera: de 0-250 volts en 20 min; 8000 volt por 2.5 h y de 8000 volts hasta alcanzar 20000 v/h. El programa se llevó a cabo en un total de 5.3 h. Al visualizar los geles con este programa se observó que las bandas protéicas no estaban bien definidas. Conforme a la literatura (ReadyPrep 2-D Satarte kit, instruction manual, BioRad) estos problemas pueden ser debidos al tiempo en el que se llevó a cabo el isoelectroenfoque, por lo cual el programa se modificó de la siguiente manera: 1 h a 250 v; 1 h a 500 v; 1 h a 1000 v; 2 h a 8000 v; de 8000 v hasta alcanzar 20000 v/h y 500 v por 2 h. El programa se llevó a cabo en 10 h. El cambio en el tiempo realizado en el programa mejoró sustancialmente la visualización de las proteínas (Fig. 40).

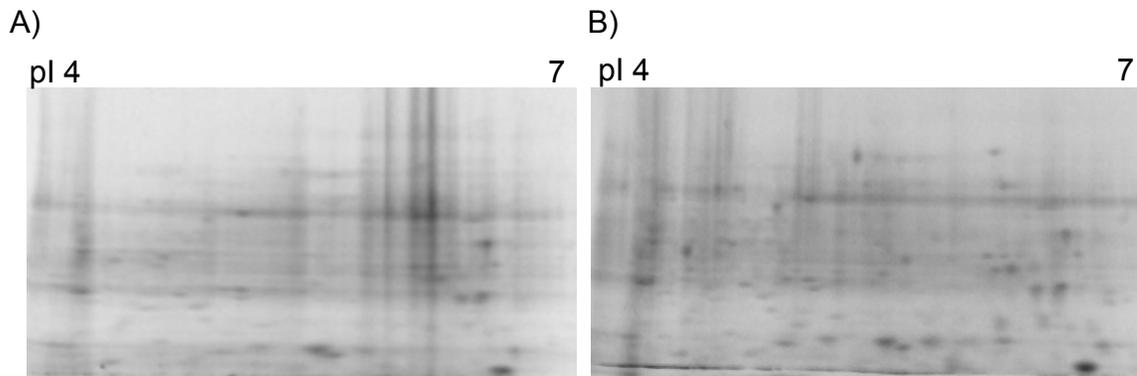


Figura 40. Geles en 2D-SDS (PAGE) de extractos protéicos de *U. tomentosa*. A) Gel con el programa de isoelectroenfoque con voltaje lineal de 5.3 horas; B) Gel con el programa de isoelectroenfoque escalonado de 10 horas.

El propósito de este trabajo fue comparar el perfil proteómico diferencial para estudiar las proteínas de las vías biosintéticas que conducen a la producción de metabolitos secundarios. Como estrategia se utilizó la elicitación mediante un tratamiento con butionina sulfoximina (BSO) y ácido jasmónico (JA) para provocar estrés oxidativo. El BSO es un inhibidor específico de la γ -glutamil cisteína sintetasa, la cual es una enzima de la biosíntesis del glutatión. Como se mencionó anteriormente la adición de este compuesto provocará una generación de especies reactivas del oxígeno (ERO's) que da lugar a una mayor producción de AOM, acompañado de un incremento en la actividad de las enzimas involucradas en su biosíntesis STR y SGD (Vera-Reyes, 2013). De acuerdo a este comportamiento se analizó el perfil proteómico de raíces elicidadas con el tratamiento descrito anteriormente tomando muestra 12 horas después de la adición. La actividad de la STR incremento 1.7 veces (65.77 ± 2.99 pKat/mg de proteína) con respecto a su control a las 12 horas (38.74 ± 4.04 pKat/mg de proteína) después del tratamiento. Por otro lado, la strictosidina β -glucosidasa (SGD) incrementó su actividad 2 veces (269.38 ± 17.10 pKat/mg de proteína) con respecto al control (123.7 ± 19.71 pKat/mg de proteína). Un incremento en la actividad enzimática de la STR y SDG bajo condiciones de elicitación con *Pythium aphanidermatum* en *C. roseus* ha sido reportado previamente por Moreno y cols. (1996) y Jacobs (2003). De acuerdo a los resultados obtenidos, se realizaron 4 réplicas de geles en dos dimensiones (2D-SDS-PAGE) a partir de extractos protéicos de cultivos de raíces de *U. tomentosa*, doce

horas después de la adición de BSO-JA, comparados con el mismo número de réplicas de extractos de cultivos del mismo tiempo pero sin presencia del elicitor.

Uno de los objetivos claves de la proteómica es identificar la expresión diferencial entre muestras control y experimentales. Es decir, es necesario identificar aquellas manchas protéicas (spots) que han sido inhibidas (desaparecen), las inducidas (aparecen) o que tienen diferente abundancia (incrementan o disminuyen en tamaño o intensidad) (Thiellement, 2002). Por muchos años sólo se tenía la opción de realizar estudios comparativos de manera visual; este tipo de comparaciones eran complicadas debido a que las diferencias que existen de gel a gel, pueden afectar la posición de los spots, conduciendo a problemas con la identificación de falsos positivos (Holchholdinger *et al.*, 2006).

Se hizo el registro y análisis de todas las imágenes para cuantificar cada proteína y permitir la comparación cualitativa de su expresión. Los geles fueron analizados con el Software Melanie 7 (GE), el cual permite la visualización y análisis de los geles. Para comparar la expresión génica en diferentes condiciones, los geles fueron traslapados (match). Este proceso representa uno de los puntos cruciales del análisis diferencial en cualquier proyecto de proteómica comparativa, ya que los geles no son idénticos. La heterogeneidad es causada por muchos factores, incluyendo la preparación de la muestra, la tinción, la movilidad desigual en las diferentes regiones del gel y la variaciones en las condiciones electroforéticas (Rose y col., 2004).

Antes de pasar al análisis se probaron dos tinciones de las proteínas una con azul de Coomassie comercial ImperialTM Protein Stain (Pierce) la cual se reporta con una sensibilidad en el intervalo de 3 a 6 ng de proteína y un colorante fluorescente SYPRO Ruby Protein (Bio-Rad) el cual tiene una sensibilidad de 1 ng, los resultados mostraron una mejor definición de manchas proteicas con el SYPRO Ruby utilizando la misma cantidad de proteína en ambos geles, por lo que los geles realizados posteriormente se tiñeron con la tinción fluorescente (Fig. 41).

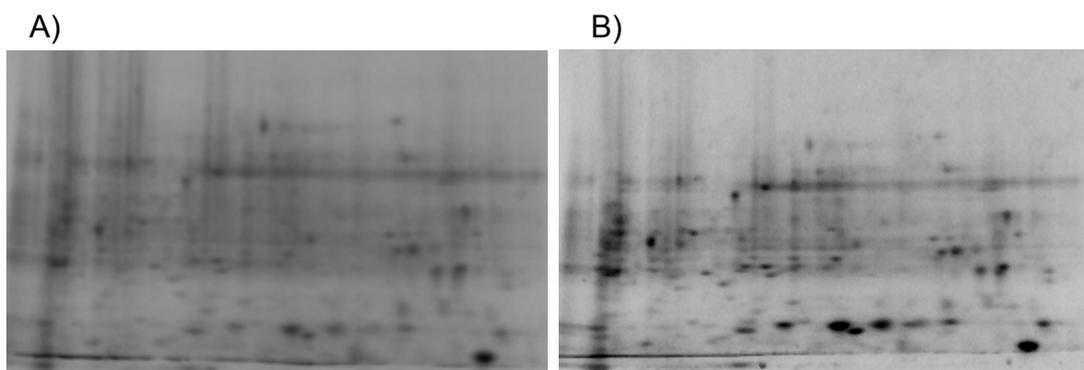


Figura 41. Geles en 2D (SDS-PAGE) de extractos de proteínas de raíces de *U. tomentosa*. A) Tinción con Imperial™ Protein Stain (Coomassie); B) Tinción con SYPRO Ruby (fluorescente).

Las dimensiones de geles de formato pequeño (10 cm) no permitió una buena separación de las proteínas por masa molecular ya que algunas de ellas se juntaban en la parte final del gel, por lo que se decidió para llevar a cabo este experimento utilizar geles de formato de 17 cm que facilitaran una mayor separación de proteínas.

Para realizar el análisis diferencial de proteínas, las imágenes fueron digitalizadas (geles previamente escaneados y convertidos a formato .TIFF). Las imágenes se agruparon en carpetas para el análisis y fueron sujetas a varios pasos de limpieza para evitar el ruido por cuestiones de tinción, que pudieran interferir con el análisis comparativo de cada mancha peptídica. Cabe destacar que el spot es el componente elemental de un gel, que delimita una región teñida relativa del mismo donde la proteína está presente. Los spots individuales en el patrón 2D fueron reconocidos, el software al identificarlos le adicionó un número único llamado ID. Para la detección de los spots se seleccionaron los parámetros que realizaron mejor la detección de cada uno de los spots (1 en su tamaño, un área mínima de 17 y una saliencia de 12), en nuestro caso no es posible realizar la cuantificación del spot ya que no tenemos el escáner adecuado calibrado con el software para tal fin. Algunos spots no fueron identificados correctamente por el programa, por lo que fue necesaria su edición manual donde se eliminaron todos aquellos que no cumplían con una distribución de curva de Gauss al analizarse por 3D y viceversa como se muestra en la Figura 42.

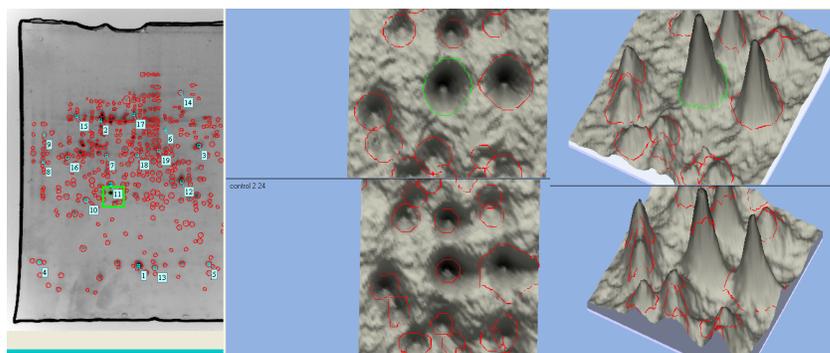


Figura 42. Identificación de manchas proteicas (spots) de un gel 2D (SDS-PAGE) de proteínas de *U. tomentosa*, analizadas con el software Melanie 7. Para validar las manchas de proteínas se utilizó la herramienta 3D (derecha).

Se eliminaron todos aquellos spots que se adicionaron automáticamente y se localizaban en las esquinas de los geles debido a que en estas áreas la escala de grises era muy alta dando falsos positivos. Algunos otros spots fueron editados debido a que cuando se comparaban entre los geles no se definían correctamente como un spot o como un grupo. La edición fue mínima sólo en los spots falsos obvios detectados (Fig. 43).

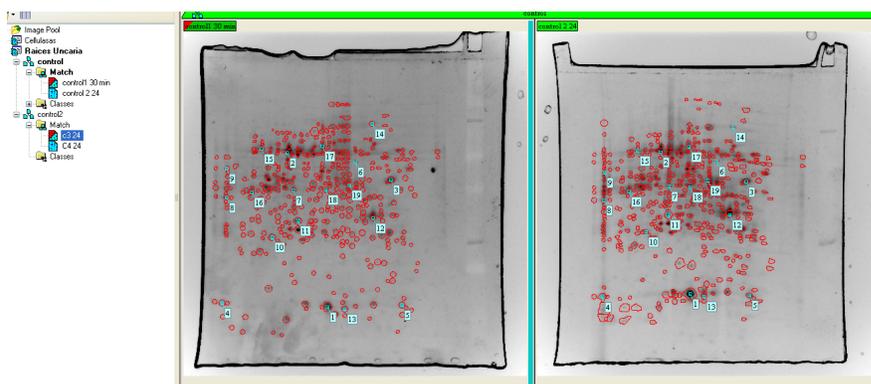


Figura 43. Imagen de la comparación de dos geles en 2D (SDS-PAGE) de raíces sin tratamiento de *U. tomentosa*, analizadas con el software Melanie 7. Se observa las proteínas utilizadas como referencia para alinear los geles.

Se hicieron cuatro réplicas de geles en 2D a partir de extractos protéicos de raíces de *U. tomentosa*, después de 24 horas de la elicitación con BSO-JA, además de cuatro réplicas de geles de proteínas del cultivo sin tratamiento (control). Los geles representativos se muestran en la figura 44.

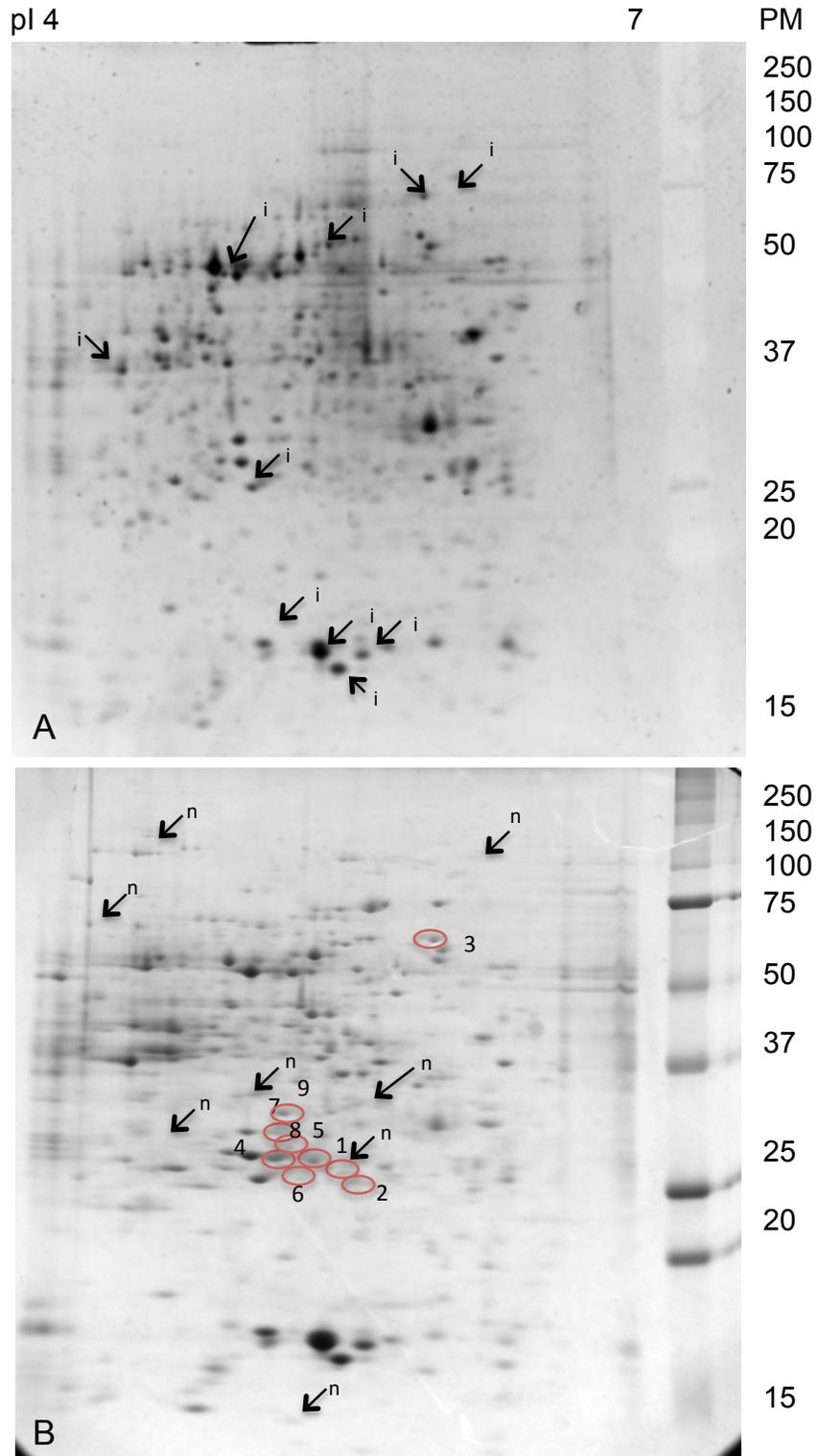


Figura 44. Gel en 2D (SDS-PAGE) de proteínas de *U. tomentosa*, A) Control; B) después del tratamiento con BSO-JA. Las manchas de proteínas que se incrementaron al doble se indican el control(i), las nuevas proteínas se indican en el elicitado (n); con círculos rojos se indican las proteínas que se enviaron a secuenciar.

Los geles muestran un mismo perfil, sin embargo los geles control mostraron mayor cantidad de proteínas que los elicitados (Tabla 9). Este comportamiento también ha sido observado en cultivos de células elicitados con *P. aphanidermatum* en *C. roseus* (Jacobs, 2003). El gel control que se tomó como referencia, fue el que tenía más manchas proteicas (480). Todos los geles se analizaron utilizando al gel de referencia como patrón. El 87% de las manchas proteicas contenidas en los geles sin tratamiento (control, cuatro geles) coincidieron con las encontradas en el gel de referencia, mientras que en el caso de los geles provenientes de los extractos proteicos elicitados, coincidieron un 85% de las manchas proteicas. Considerando que el número de manchas proteicas disminuyeron en 70 después de la elicitación, se analizó con detalle para enviar a secuenciar aquellas proteínas nuevas que aparecieron después del tratamiento (Fig. 44) o regiones donde anteriormente se encontraron enzimas del metabolismo secundario como las correspondientes a las isoformas de estrictosidina sintasa en los estudios proteómicos de extractos de *C. roseus* (Jacobs, 2003).

Tabla 9. Número de manchas proteicas detectadas que coinciden en geles en 2D de *U. tomentosa* de raíces elicitadas con BSO-JA y raíces control.

Extractos proteicos	Número promedio de manchas proteicas en un gel ¹	Promedio de manchas que coincidieron ¹
Raíces control	443 ± 37	357 (87 %)
Raíces elicitadas	320 ± 33	287 (85 %)

¹) Promedio de 4 geles.

Se eligió para enviar a secuenciar la región de un punto isoeléctrico entre 5-6 y una masa aproximada de 30 KDa, donde se identificaron nueve proteínas, entre las cuales se encontraron dos isoformas de la estrictosidina sintasa (7, 9). De las proteínas que aparecieron como nuevas se identificó como una triosa fosfato isomerasa de cloroplasto (1), se identificó otra triosa fosfato isomerasa citosólica (2,8), ascorbato peroxidasa citosólica (3), Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (4), una identificada como proteosoma subunidad alfa y una proteína de unión a RNA rica en

glicina (5). Las características obtenidas de estas proteínas se encuentran en la Tabla 10.

De las proteínas identificadas de nuestro interés destaca la estrictosidina sintasa (STR), al ser la primera enzima en la biosíntesis de los AIT. Es así que en los extractos protéicos de raíces de *U. tomentosa* después de la adición de BSO-JA se identificaron por espectrometría de masas dos isoformas de STR. Jacobs (2003), reportó siete isoformas de la STR, de las cuales sólo tres isoformas fueron identificadas en los cultivos control por espectrometría de masas y cuatro más por Wester blot en cultivos control. Después de la elicitación con *P. aphanidermun* estos autores encontraron que se indujeron cinco isoformas de STR. En nuestro caso la actividad de la STR se utilizó junto con la de SGD como un indicador de activación del metabolismo secundario bajo condiciones de elicitación con BSO-JA. De tal forma que el incremento en la actividad de esta enzima se correlaciona con el incremento en la producción de AOM. Se sabe que el ácido jasmónico es una molécula señal de activación para la biosíntesis de AIT, involucrada en la activación de factores de transcripción como ORCA que a su vez se ha observado que activa la transcripción de la STR (Peebles *et al.*, 2009). La información obtenida nos demuestra las modificaciones postraduccionales que se llevan a cabo, y de cómo los incrementos de la actividad en diferentes tiempos, podría ser una aproximación proteómica de las isoformas de STR con la actividad enzimática.

La ascorbato peroxidasa es una enzima que participa en el ciclo ascorbato-glutati6n, que es uno de los sistemas antioxidantes más importantes para la remoci6n de H₂O₂ generado en la célula. En este ciclo el H₂O₂ es reducido a agua por la ascorbato peroxidasa utilizando al ascorbato como donador de protones. El ascorbato a su vez, es un radical que debe ser convertido espontáneamente por la monodehidro-ascorbato reductasa (MDAR) a dehidro-ascorbato (DHA). El DHA es posteriormente reducido a ascorbato por la dehidro-ascobato reductasa (DHAR) a expensas del glutati6n reducido.

Tabla 10. Proteínas identificadas de geles en 2D de *Uncaria tomentosa**.

No Mancha	Nombre	No Acceso	Masa (e)*	pI (e)	Masa teórica (t)	pI (t)	Organismo	Secuencia
1	Triosa fosfato isomerasa cloroplástica	P46225 (TPIC_SECCE)	28	5.4	31.63	6.02	<i>Secale cereale</i>	FFVGGNWKCNT KESISK RHVIGEDDE FIGKK TFDVGFK
2	Triosa fosfato isomerasa citosólica	P48494 (TPIS_ORYSJ)	27	5.49	27.06	5.38	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	FFVGGNWK VAYALSQ GLKVIACVGE TLEGRESGST MDVVAAQTK
3	Ascorbato peroxidasa citosólica	Q40589 (Q40589_TOBAC)	29	5	27.45	5.43	<i>Nicotiana tabacum</i>	EDKTEPPVER LPDATKGS DH LRDVFK ALLSDPAFRPL NCAPMLR
4	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa	D8V9G4 (D8V9G4_9GENT)	60	6.18	50.48	5.15	<i>Uncaria tomentosa</i>	GGDHIHAGTVVGK DLAAEGNEIIR AMHAVIDRLS
5	Proteína de unión a RNA rica en glicina	Q9M6A1 (Q9M6A1_CATRO)	20	5.5	14.1	5.8	<i>C. roseus</i>	GSGPR GGGGGGGFRG EGGGCYGGGGRR
6	Proteosoma subunidad alfa	Q38HT0 (Q38HT0_SOLTU)	27	5.26	27.1	5.6	<i>Solanum tuberosum</i>	TTIFSPGER DGVVLVGEKK DSTSLTSEK
7	Estrictosidina sintasa	Q94LW9 (Q94LW9_9GENT)	31	5.22	38.8	5.15	<i>Ophiorrhiza pumila</i>	YDDRQVQ DIIR
8	Triosa fosfato isomerasa	Q3HRV9 (Q3HRV9_SOLTU)	30	5.3	29.95	5.88	<i>Solanum tuberosum</i>	FFVGGNWK VAYALSQGLK IYGGSVNGANCK
		D7SEV7					<i>Mitrocopa</i>	VDRDQVQ

Estudios previos del grupo de trabajo demostraron que la adición combinada de BSO-JA incrementa la actividad de peroxidasas, la cual puede ocurrir en correlación con una acumulación de H₂O₂ a nivel celular, debido a la inhibición de la formación del glutatión ocasionada por dicho tratamiento. Por lo anterior, se ha postulado que para poder mantener el equilibrio redox la célula estaría activando el sistema enzimático y no enzimático incluidos los metabolitos secundarios (Vera-Reyes *et al.*, 2013; Ramos-Valdivia *et al.*, 2012), al mismo tiempo la presencia de esta enzima nos refleja las condiciones de estrés oxidativo. Bajo condiciones de estrés salino la expresión de la ascorbato peroxidasa se indujo en *O. sativa* mientras que bajo el mismo tratamiento en *A. thaliana* fue reducida (Zhang *et al.*, 2012).

La ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (Rubisco) es responsable de la fijación de CO₂ durante la fotosíntesis. La triosa fosfato isomerasa es una enzima involucrada también en la asimilación de los carbohidratos. Estudios previos reportaron que bajo estrés salino las enzimas involucradas en el metabolismo del carbono pueden tener diferentes respuestas como una inducción o represión (Zhang *et al.*, 2012). También se ha observado que bajo condiciones de estrés oxidativo la Rubisco disminuye su actividad al haber represión a nivel transcripcional y transduccional de la misma provocada por jasmonatos (Weidhase *et al.*, 1987).

En otras plantas se ha tenido poco éxito en la identificación de enzimas del metabolismo secundario; es así que en el perfil proteómico de *Panax ginseng*, más del 20% de las proteínas encontradas estaban relacionadas con el metabolismo primario y la respuesta a estrés, sólo se reportó algunas proteínas que se relacionaban indirectamente con la producción de ginsenosidos (Nam *et al.*, 2005). En otros estudios, realizados con extractos de *Papaver somniferum* en donde encontraron sólo una proteína que de alguna manera se puede relacionar con la biosíntesis de morfina (Decker *et al.*, 2000; Aghaei y Komatsu, 2013).

La proteosoma subunidad alfa esta siempre presente en los procesos proteolíticos de vacuola, es decir controla la función de las proteínas regulando su

concentración mediante su degradación. Para que una proteína sea degradada es necesario que se le realice un marcaje con ubiquitina. La ubiquitinación de proteínas es un mecanismo de etiquetado, como lo son la fosforilación o la glicosilación (Kurepa y Smalle, 2008).

Las proteínas de unión a RNA ricas en glicina (GRP) regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional, en procesos como la maduración del RNAm (splicing), el transporte del RNAm al citoplasma, su estabilidad por la poliadenilación y la traducción del mismo, a su vez estas proteínas modulan la acción de otros factores de regulación (Glisovic *et al.*, 2008). Las GRP se caracterizan por la presencia de regiones conservadas (motivos y dominios), incluyendo motivos de reconocimiento de RNA (RRM), dominios ricos en glicina, dominios K y motivos proteínas dedos de zinc (Lorkovic' y Barta, 2002). El incremento en la expresión de los genes de GRP en *A. thaliana* y en *O. sativa* se ha involucrado como una respuesta de las plantas bajo condiciones de estrés (Kim *et al.*, 2010).

La principal limitación de proteínas del metabolismo secundario es la falta de bases de datos de estas proteínas. SWISS-PROT es una plataforma que contiene pocas proteínas secuenciadas de *C. roseus* (Jacobs *et al.*, 2005), *Panax ginseng* (Nam *et al.*, 2005), *Papaver somniferum* (Decker *et al.*, 2000), en nuestro caso solo una de *U. tomentosa* la Rubisco (NUCLEOTIDE SEQUENCE).

Nuestros resultados muestran que en cultivos de *U. tomentosa*, el incremento en la producción de AOM y de alcaloides glucoindólicos (3 α -dihidrocadambina y dolicantósido) está asociado con el estrés oxidativo provocado por los elicitores H₂O₂ y BSO-JA, siendo el BSO-JA el mejor tratamiento, para la inducción del sistema antioxidante y producción de estos alcaloides. Las enzimas relacionadas a la estrictosidina, STR y SGD, tienen un papel regulatorio en la biosíntesis de alcaloides por el incremento en sus actividades después de la elicitación. Mientras la regulación de los transcritos de RNAm de estas enzimas mostró un patrón diferente con respecto al tiempo para ambos genes. Estos descubrimientos revelan la existencia

de redes complejas de regulación que podrían estar controlando la biosíntesis de AOM y alcaloides glucoindólicos en cultivos de raíces de *U. tomentosa*. Adicionalmente, se encontró que un extracto proteico parcialmente purificado de raíces de *U. tomentosa* posee la habilidad de catalizar la formación de dollicantósido a partir de *N*- ω -metiltriptamina y secologanina. Este estudio provee información útil en relación con aplicaciones biotecnológicas de cultivos de raíces de *U. tomentosa* para la producción de alcaloides indólicos y glucoindólicos.

Las características de la SGD de *U. tomentosa* se resumen en que presenta una masa molecular teórica de aproximada de 60 KDa, un pH óptimo de 6.3 en presencia del amortiguador de fosfatos, un *pI* teórico de 5.76, una K_m de 1.096 mM; V_{max} de 42.75 nmol.min⁻¹mg⁻¹ y como productos de formación la catenamina. La secuencia de la enzima purificada tiene identidad del 60% en una región conservada que presentan otras strictosidina glucosidasas reportadas (Geerlings *et al.*, 2000; Warzecha *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2011;).

El cDNA completo clonado de la *Ut_PSGD* con n° de acceso JQ3666085, contiene un marco abierto de lectura de 1662 pb, que codifica para 533 residuos de aminoácidos, con una masa molecular teórica de 63.32 KDa.

La distribución de la actividad enzimática de la SGD se cuantificó en diferentes partes de la planta, teniendo la mayor actividad enzimática en la parte aérea de las plántulas y la menor actividad en los tallos. Estos resultados se correlacionan con la acumulación del transcrito teniendo mayor cantidad de transcritos de la SGD en hojas de plántulas jóvenes. Los resultados demuestran una correlación positiva entre el contenido de AOM en los diferentes tejidos y las enzimas involucradas en la biosíntesis de estos compuestos, indicando que los AOM están principalmente almacenados en la parte aérea de las plantas en hojas jóvenes (Luna-Palencia *et al.*, 2013).

El proteoma de *U. tomentosa* bajo condiciones de elicitación con BSO-JA, mostró 320 proteínas de las cuales nueve proteínas se identificaron. Se encontraron dos isoformas de la estroictosidina sintasa; de las proteínas que aparecieron como nuevas se identificó una como triosa fosfato isomerasa de cloroplasto, se identificó otra triosa fosfato isomerasa citosólica, una ascorbato peroxidasa citosólica, una proteína de unión a RNA rica en glicina, una ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa y una identificada como proteosoma subunidad alfa.

7. Conclusiones

La biosíntesis de alcaloides indolterpénicos y oxindólicos monoterpénicos en *Uncaria tomentosa* se encuentra regulada a nivel del metabolismo de la estrictosidina. La inducción de la actividad y la expresión de transcritos de la estrictosidina sintasa y estrictosidina β -glucosidasa se correlacionó con la producción de alcaloides bajo condiciones de estrés oxidativo.

Las características de la estrictosidina β -glucosidasa de *U. tomentosa* tienen similitud con otras enzimas de especies productoras de alcaloides indolterpénicos.

8. Recomendaciones

Analizar por HPLC-MS los productos de reacción de la SGD usando extractos protéicos provenientes de raíz y hojas .

Mejorar las condiciones de reacción para el ensayo enzimático de la SGD, utilizando como sustrato dollicantósido y extractos protéicos provenientes de raíz y hojas.

Realizar estudios específicos en *U. tomentosa* para conocer la localización intracelular de la SGD por la importancia de la regulación en la producción de AIT mediante flujo metabólico.

Expresar el cDNA completo de la *Ut_PSGD* para confirmar su actividad enzimática.

Secuenciar otras manchas proteicas del proteoma de *U. tomentosa* bajo condiciones de estrés oxidativo, con el fin de encontrar proteínas que estén involucradas en el proceso de biosíntesis de los AOM.

9. Referencias

Aerts RJ, de Waal A, Pennings EJM, Verpoorte R. (1991). The distribution of strictosidine-synthase activity and alkaloids in *Cinchona* plants. *Planta*. 183:536-541.

Achenbach H, Benirschke M. (1996). Confirmation of the absolute configuration of dolichantoside and isodolichantoside by synthesis from (2)-secologanin. *Phytochemistry*. 44:1387-1390.

Aghaei K, Komatsu S. (2013). Crop and medicinal plants proteomics in response to salt stress. *Front Plant Sci*. 4:1-9.

Aisaka K, Hattori Y, Kihara T, Ishihara T, Endo K, Hikino H. (1985). Hypotensive action of 3 α -dihydrocadambine, an indole alkaloid glycoside of *Uncaria* hooks. *Planta Med*. 51:424-427.

Ali MB, Hahn EJ, Paek KY. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induce oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules*. 12:607-621.

Angenot L. and Denoël A. (1971). Alcaloïdes des loganiacees, Sur l'isolement d'un nouvel alcaloïde a partir du *Strychnos usambarensis*. *Planta Med*. 23:226-323.

Aquino R, De Tommasi N, De Simone, Pizza C. (1997). Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry*. 45:1035-1040.

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 22:195-201.

Barleben L, Ma X, Koepke J, Peng G, Michel H., Stöckigt J. (2005). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of strictosidine glucosidase, an enzyme initiating biosynthetic pathways to a unique diversity of indole alkaloid skeletons. *Biochim Biophys Acta*. 1747:89-92.

Barleben L, Panjikar S, Ruppert M, Koepke J, Stöckigt J. (2007). Molecular architecture of strictosidine glucosidase: The gateway to the biosynthesis of the monoterpenoid indole alkaloid family. *The Plant Cell*. 19: 2886-2897.

Bernhardt P, McCoy E, O'Connor SE. (2007). Rapid identification of enzyme variants for reengineered alkaloid biosynthesis in periwinkle. *Chem Biol*. 14:888-897.

Brandt V, Tits M, Penelle J, Frédérich M, Angenot L. (2001). Main glucosidase conversion products of the gluco-alkaloids dolichantoside and palicoside. *Phytochemistry*. 57:653-659.

Chan AP, Crabtree J, Zhao Q, Lorenzi H, Orvis J, Puiu D, Melake-Berhan A, Jones KM, Redman J, Chen G, Cahoon EB, Gedil M, Stanke M, Haas BJ, Wortman JR, Fraser-Liggett CM, Ravel J, Rabinowicz PD. (2010). Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nat Biotechnol*. 28:951-956.

Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162:156-159.

Conchie J, Levvy GA. (1957). Inhibition of glycosidases by aldonolactones of corresponding configuration. *Biochem J*. 65:389-395.

Davies G, Henrissat B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3:853-859.

Decker G, Wanner G, Zenk MH, Lottspeich F. (2000). Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis*. 21:3500-3516.

De Luca V, St Pierre B. (2000). The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *Trends Plant Sci*. 5:168-173.

Dick R, Frey M, Gierl A, Rattei T, Schwab W, Kuester B, Haslbeck M. (2010). UDP-glucosyltransferases and beta-glucosidases of the benzoxazinoid synthesizing dicot plants *Consolida orientalis* and *Lamium galeobdolon*. Unpublish. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE.

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne GJ. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Mol Biol*. 300:1005-1016.

Endo K, Oshima Y, Kikuchi H, Koshihara Y, Hikino H. (1983). Hypotensive principles of *Uncaria hooks*. *Planta Med*. 49:188-190.

Esen A. (1993). In: β -glucosidases. Biochemistry and molecular biology. ACS Symposium Series 533 (Esim A, ed.), Maple Press, New York, pp. 1-15.

García Prado E, García GMD, De la Puerta VR, Espartero SJL, Sáenz RMT. (2006). Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. *Phytomedicine*. 17:280-284.

Ganzera M, Muhannad I, Khan RA, Khan IA. (2001). Improved method for determination of oxindole alkaloids *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *Planta Med*. 67:447-450.

Geerlings A. (1999). An enzyme in the biosynthesis of pharmaceutically important indole alkaloids. PhD Thesis. Leiden University. The Netherlands. ISBN 90-74538-40-1.

Geerlings A, Ibanez MM, Memelink J, van Der Heijden R, Verpoorte R. (2000). Molecular cloning and analysis of strictosidine beta-D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J Biol Chem* 275:3051-3056.

Gerasimenko I, Sheludko Y, Ma X, Stöckigt J. 2002. Heterologous expression of a *Rauvolfia* cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to over 2000 monoterpenoid indole alkaloids. *Eur J Biochem*. 269:2204-2213.

Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett*. 582:1977-1986.

Goklany S, Loring RH, Glick J, Lee-Parsons CWT. (2009). Assessing the limitations to terpenoid indole alkaloid bio-synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures through gene expression profiling and precursor feeding. *Biotechnol Prog*. 25:1289-1296.

Guex, N, Peitsch, MC. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*. 18:2714-2723.

Guirimand G, Vourdavault V, St-Pierre B, Burlat V. (2010a). Biosynthesis and Regulation of Alkaloids. In: Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives; E.C. Pua and M.R. Davey eds. Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg. 2:139-160.

Guirimand G, Courdavault V, Lanoue A, Mahroug S, Guihur A, Blanc N, Giglioli-Guivarc'h N, St-Pierre B, Burlat V. (2010b). Strictosidine activation in Apocynaceae: towards a “nuclear time bomb”? *BMC Plant Biol.* 10:182-202.

Guo ZJ, Ohta Y. (2003). A synergistic effect of glutathione depletion and elicitation on the production of 6-methoxymellein in carrot cells. *Plant Cell Rep.* 12:617-620.

Hahn MG. (1996). Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu Rev Phytopath.* 34:387-412.

Hamilton R.G., Saunders G.N., McLean S. (1983). The synthesis of 3 α dihydrocadambine and 3 β dihydrocadambine from secologanin. *Can J Chem.* 61: 284-287.

Hallard D, der Heijden R, Contin A, Tomas Jimenez E, Snoeijer W, Verpoorte R, Jensen SR, Lopes Cardoso MI, Pasquali G, Memelink J, Hoge J. (1998). An assay for secologanin in plant tissues based on enzymatic conversion into strictosidine. *Phytochem Anal.* 9:162-169.

Hashimoto T, Yamada Y. (2003). New genes in alkaloid metabolism and transport. *Curr Opin Biotechnol.* 14:163-168.

Hemscheidt T, Zenk MH. (1980). Glucosidases involved in indole alkaloid biosynthesis of *Catharanthus* cell cultures. *FEBS Lett.* 110:187-191.

Henrissat B, Bairoch A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 316:695-696.

Hochholdinger F, Sauer M, Dembinsky D y Hoecker N. (2006). Proteomic dissection of plant development. *Proteomics.* 6:4076-4083.

Hong SB, Hughes EH, Shanks JV, San KY, Gibson SI. (2003). Role of the non-mevalonate pathway in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Prog.* 19:1105-1108.

Huerta HAA, Marín LR, Ponce NT, Cerda-García RCM, Trejo TG, Ramos VAC. (2009). Oxidative stress induces alkaloid production in *Uncaria tomentosa* root and cell cultures in bioreactors. *Engineering in Life Sciences.* 9:211-218.

Huerta HAA. (2010). Eventos bioquímicos del estallamiento oxidativo inducido por estrés y su relación con la producción de alcaloides indolterpénicos en cultivos de raíces de *Uncaria tomentosa*. Tesis de Doctorado, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Hung ShH, Yu ChW, Lin ChH. (2005). Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot Bull Acad Sin.* 46:1-10.

Jacobs D. (2003). Proteome analysis of the medicinal plant *C. roseus*. PhD Thesis. Leiden University. The Netherlands. ISBN 90-6464-880-8.

Jacobs DI, Gaspari M, van der Greef J, van der Heijden R, Verpoorte R. (2005). Proteome analysis of the medicinal plant *Catharanthus roseus*. *Planta.* 221: 690-704.

Jones P, Vogt T. (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta.* 213:164-74.

Kan F, Husson HP. (1980). Biomimetic synthesis of yohimbine and heteroyohimbine alkaloids from 4, 21-dehydrogeissoschizine. *Tetrahedron Lett.* 21:1463-1466.

Kim JY, Kim WY, Kwak KJ, Oh SH, Han YS, Kang H. (2010). Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* during cold adaptation process. *J Exp Bot.* 61: 2317-2325.

Kumar V, Khanna AK, Khan MM, Singh R, Singh S, Chander R, Mahdi F, Saxena JK, Saxena S, Singh VK, Singh RK. (2009). Hypoglycemic, lipid lowering and antioxidant activities in root extract of *Anthocephalus indicus* in alloxan induced diabetic rats. *Indian J Clin Biochem.* 24: 65-69.

Kurepa J, Smalle JA. (2008). Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie.* 90:324-335.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680–685.

Laus G. (2004). Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. *Phytother Res.*18: 259-274.

Leimgruber RM, Malone JP, Radabaugh MR, LaPorte ML, Violand BN, Monahan JB. (2002). Development of improved cell lysis, solubilization and imaging approaches for proteomic analyses. *Proteomics.* 2:135-144.

Liao Z, Chen M, Guo L, Gong Y, Tang F, Sun X, Tang K. (2004). Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo*. *Prep Biochem Biotechnol.* 34:209-214.

Liu W, Chen R, Chen M, Zhang H, Peng M, Yang C, Ming X, Lan X, Liao Z. (2012). Tryptophan decarboxylase plays an important role in ajmalicine biosynthesis in *Rauvolfia verticillata*. *Planta.* 236:239-250.

Lorkovic' ZJ, Barta A. (2002). Genomic analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research.* 30:623-635.

Luijendijk TJC. (1995). Strictosidine glucosidase in indole alkaloid biosynthesis characteristics and physiological implications. PhD Thesis. Leiden University. The Netherlands. ISBN 90-74538-09-6.

Luijendijk TJC, Nowak A, Verpoorte R. (1996a). Strictosidine glucosidase from suspension cultured cells of *Tabernaemontana divaricata*. *Phytochemistry*. 41:1451-1456.

Luijendijk TJC, Van der Meijenden E, Verpoorte R. (1996b). Involvement of strictosidine as a defensive chemical in *Catharanthus roseus*. *J Chem Ecol*. 22: 1355-1366.

Luijendijk TJC, Stevens LH, Verpoorte R. (1998). Purification and characterization of strictosidine β -glucosidase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Plant Physiol Biochem*. 36: 419-425.

Luna-Palencia GR, Cerda-García-Rojas CM, Rodríguez-Monroy M, Ramos-Valdívía AC. (2005). Influence of auxins and sucrose in monoterpene oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* cell suspension culture. *Biotechnol Progr*. 21:198-204.

Luna-Palencia GR, Cerda-García-Rojas CM, Orozco-Cárdenas M, Ramos-Valdívía AC. (2007). Biosynthesis of oxindole alkaloids in plantlets and roots cultures of *Uncaria tomentosa*. Plant for human health in the post genome era. VTT Symposium 249, Helsinki, Finland.

Luna-Palencia GR, Huerta-Heredia AA, Cerda-García-Rojas CM, Ramos-Valdívía AC. (2013). Differential alkaloid profile in *Uncaria tomentosa* micropropagated plantlets and root cultures. *Biotechnol Lett*. 35:791-797.

Manchenko, G.P. Glutathione reductase. In: Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels. Edited by Gennady, P. and Manchenko, G.P. CRC Press, Boca Raton, FL; 1994; 82-83.

Marín LR. (2009). Efecto de la estimulación biótica en la producción de alcaloides indólicos en cultivos celulares de *Uncaria tomentosa* en biorreactor. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW. (2001). ORCAization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci.* 6:212-219.

Menke FLH, Champion A, Kijne JW, Memelink J. (1999). A novel jasmonate and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene STR interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *EMBO Journal.* 18:4455-4463.

Morant AV, Paquette SM, Bak S. (2008). The beta-glucosidases responsible for bioactivation of hydroxynitrile glucosides in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 147:1072-1091.

Moreno PRH, Poulsen C, van der Heijden R, Verpoorte. (1996). Effects of elicitation on different metabolic pathways in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell suspension cultures. *Enzym Microbiol Technol.* 18:99-107.

Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497.

Nam MH, Kim SI, Liu JR, Yang DC, Lim YP, Kwon KH, Yoo JS, Park YM. (2005). Proteomic analysis of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 815:147-55.

Neill S, Desikan R, Hancock J. (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 5:388-395.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 66:1022-1037.

Nomura T, Lara-Quesada A, Kutchan TM. (2008). The new β -D-glucosidase in terpenoid-isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Psychotria ipecacuanha*. *J Biol Chem.* 283:34650–34659.

Nordahl PT, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods.* 8:785-786.

O'Connor SE, Maresh JJ. (2006). Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Nat Prod Rep.* 23:532-547.

O'Farrell PH. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 250:4007-4021.

Ortholand JY, Ganesan A. (2004). Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Curr Opin Chem Biol.* 8:271-280.

Pauw B, Memelink J. (2005). Jasmonate-responsive gene expression. *J Plant Growth Regul.* 23:200-210.

Peebles CA, Hughes EH, Shanks JV, San KY. (2009). Transcriptional response of the terpenoid indole alkaloid pathway to the overexpression of ORCA3 along with jasmonic acid elicitation of *Catharanthus roseus* hairy roots over time. *Met Eng.* 11:76-86.

Pennings EJM, Bosch RA, vd Heijden R, Stevens LH, Duine JA, Verpoorte R. (1982). Assay of strictosidine synthase from plant cell cultures by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 176: 412-415.

Peterson G. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 83, 346-356.

Pütter J. (1974). Peroxidases. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 2. New York: Verlag Chemie-Academic Press. 685–690.

Qin WM, Lanb WZ. (2004). Fungal elicitor-induced cell death in *Taxus chinensis* suspension cells is mediated by ethylene and polyamines. *Plant Science.*166:989-995.

Quan LJ, Zhang B, Shi WW, Li HY. (2008). Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of reactive oxygen species network. *J Integr Plant Biol.* 50:2-18.

RA Hu TT, Pattyn P, Bakker EG, Cao J, Cheng JF, Clark RM, RA Fahlgren N, Fawcett JA, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, RA Hollister JD, Ossowski S, Otitlar RP, Salamov AA, RA Schneeberger K, Spannagl M, Wang X, Guo YL. (2011).The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nat Genet.* 43:476-481.

Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Biochem.* 37: 91-102.

Ramos-Valdivia AC, Cerda García Rojas C. (2007). Interrelaciones metabólicas en la producción de alcaloides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* de la célula al biorreactor. XII Congreso Nacional de Bioquímica y Biología molecular. 11-15 Noviembre, Boca del Río, Veracruz, México.

Ramos-Valdivia AC, Huerta-Heredia AA, Trejo-Tapia G, Cerda-García-Rojas CM. (2012). Secondary metabolites as non-enzymatic plant protectors from oxidative stress. In: Anjum NA, Umar S, Ahmad A, editors. *Oxidative Stress in Plants: Causes, Consequences and Tolerance*. New Delhi: International Publishing House. 413–441.

Rijhwani SK, Shanks JV. (1998). Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root culture. *Biotechnol Prog*. 14:442-449.

Rose JKC, Bashir S, Giovannoni JJ, Molly MJ, Saravanan RS. (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J*. 39:715-733.

Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*.4:406-425.

Sánchez-Fernández R, Fricker M, Corben, LB, White NS, Sheard N, Leaver C J, Van Montagu M, Inzé D, May M J. (1997). Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:2745-2750.

Santos-Mendoza Y. (2010). Regulación de la biosíntesis de alcaloides Indolterpénicos por Jasmonatos en cultivos de raíces de *Uncaria tomentosa*. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN, México, D.F.

Saunders GN, Hamilton RG, McLean S. (1982). A synthesis of 3 α dihydrocadambine. *Tetrahedron Letters*. 23: 2358-2360.

Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31:3381-

3385.

Seetang-Nun Y, Wungsintaweekul J, De-Eknamkul W. (2011). The indole alkaloid biosynthetic genes from *Mitragyna speciosa*. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE.

Seki M, Iida K, Satou M, Sakurai T, Akiyama K, Ishida J, Nakajima M, Enju A, Kamiya A, Narusaka M, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. (2002). *Arabidopsis thaliana* full-length cDNA. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE.

Shukla AK, Shasany AK, Verma RK, Gupta MM, Mathur AK, Khanuja SPS. (2010). Influence of cellular differentiation and elicitation on intermediate and late steps of terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Protoplasma*. 242:35-47.

Sibénil Y, Benhamron S, Memelink J, Giglioli-Guivarc, Thiersault M, Boisson B, Doireau P, Gantet P. (2001). *Catharanthus roseus* G-box binding factors 1 and 2 act as repressors of strictosidine synthase gene expression in cell cultures. *Plant Mol Biol*. 45:477:488.

Ślesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z. (2007). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochem Pol*. 54:39-50.

Stevens LH, Schripsema J, Pennings EJM, Verpoorte R. (1992). Activities of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in suspension cultures of *Catharanthus*, *Cinchona* and *Tabernaemontana* species. *Plant Physiology Biochem*. 30: 675–681.

Stevens LH. (1994). Formation and conversion of strictosidine in the biosynthesis of

monoterpenoid indole and quinoline alkaloids. PhD Thesis. Leiden University, The Netherlands.

Stöckigt J. (1978). Enzymatic formation of intermediates in the biosynthesis of ajmalicine: strictosidine and cathenamine. *Phytochemistry*. 18:965-971.

Stöckigt J, Panjikar S. (2007). Structural biology in plant natural product biosynthesis-architecture of enzymes from monoterpenoid indole and tropane alkaloid biosynthesis. *Nat Prod Rep*. 24:1382-400.

Stöckigt J, Barleben L, Panjikar S, Loris E. (2008). 3D-Structure and function of strictosidine synthase the key enzyme of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Plant Physiol Biochem*. 46:340-355.

Stockigt J, Hammes B, Ruppert M. (2010). Construction and expression of a dual vector for chemo-enzymatic synthesis of plant indole alkaloids in *Escherichia coli*. *Nat Prod Res*. 24:759-766.

Sun Y, Luo H, Li Y, Sun C, Song J, Niu Y, Zhu Y, Dong L, Lv A, Tramontano E, Chen S. (2011). Pyrosequencing of the *Camptotheca acuminata* transcriptome reveals putative genes involved in camptothecin biosynthesis and transport. *BMC Genomics*.12:533-533.

Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, Patra B, Singh SK, Yuan L. (2011). The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*. 157: 2081–2093.

Szabó LF. (2008a). Rigorous biogenetic network for group of indole alkaloids derived from strictosidine. *Molecules* .13:1875-1896.

Szabó, LF. (2008b). Molecular evolutionary lines in the formation of indole alkaloids

derived from secologanin. En ARKIVOC (chemotaxonomy in indole alkaloids, Parte 4). 167-181.

Tastet C, Charmont S, Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. (2003). Structure efficiency relationships of zwitterionic detergents as protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*. 3:111-121.

Tang Z., Yang L., Zu Y., Guo X. (2009). Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H₂O₂ in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Growth Regul.* 57:15-20.

Thiellemen H, Zivy M y Plomion C. (2002). Combining proteomic and genetic studies in plants. *J Chromatogr B*. 782:137-149.

Treimer JF, Zenk MH. (1979). Purification and properties of strictosidine synthase, the key enzyme in indole alkaloid formation. *Eur J Biochem*. 101:225-233.

Trejo-Tapia G, Sepúlveda-Jiménez G, Cerda-García-Rojas CM, Rodríguez-Monroy M, Ramos-Valdivia AC. (2005). Monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. cell suspension cultures in a stirred tank bioreactor. *Biotechnol Prog*. 21:786-792.

Trejo-Tapia G, Sepúlveda-Jiménez G, Trejo-Espino JL, Cerda-García-Rojas CM, de la Torre M, Rodríguez-Monroy M, Ramos-Valdivia AC. (2007). Hydrodynamic stress induces monoterpenoid oxindole alkaloid accumulation by *Uncaria tomentosa* (Willd) D. C. cell suspension cultures via oxidative burst. *Biotechnol Bioeng*. 98:230-238.

Van der Fits L, Memelink J. (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*.14:295-297.

Vaughan D, Ord B. (1990). Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*. *J Sci Food Agric*. 52:289-299.

Vera-Reyes I, Huerta-Heredia AA, Ponce-Noyola T, Flores-Sanchez IJ, Esparza-García F, Cerda-García-Rojas CM, Trejo-Tapia G, Ramos-Valdivia AC. Strictosidine-related enzymes involved in the alkaloid biosynthesis of *Uncaria tomentosa* root cultures grown under oxidative stress. *Biotechnol Prog*. DOI:10.1021/btpr.1723.

Verpoorte R. (2000). Plant secondary metabolism. In: Verpoorte R., Alfermann A.W. (eds) *Metabolic engineering of plants secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 1-29.

Vinther-Morant QA, Jorgensen K, Jorensen C, Paquette SM, Sánchez-Pérez R, Lindberg BM, Bak S. (2008). β -glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*. 69:1795-1813.

Warzecha H, Gerasimenko I, Kutchan TM, Stöckigt J. (2000). Molecular cloning and functional bacterial expression of a plant glucosidase specifically involved in alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*. 54:657-667.

Wasternack C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* .100: 681-697.

Weidhase RA, Lehmann J, Kramell H, Sembdner G, Parthier B. (1987). Degradation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methyl ester, and counteraction by cytokinin. *Physiol Plantarum*. 69:161-166.

Yamazaki Y, Urano A, Sudo H, Kitajima M, Takayama H, Yamazaki M, Aimi N, Saito K. (2003). Metabolite profiling of alkaloids and strictosidine synthase activity in

camptothecin producing plants. *Phytochemistry*. 62:461-470.

Yerkes N, Wu JX, McCoy E, Galan MC, Chen S, O'Connor SE. (2008). Substrate specificity and diastereoselectivity of strictosidine glucosidase, a key enzyme in monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Bioorg Med Chem Lett*. 18:3095-3098.

Zhang H, Han B, Wang T, Chen S, Li H, Zhang Y, Dai S. (2012). Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics. *J Proteome Res*. 11:49-67.

Zhao J, Davis LC, Verpoorte R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*. 23: 283-333.

Zhao J, Verpoorte R. (2007). Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. *Phytochem Rev*. 6: 435-457.

Zhou JY, Mo ZX, Zhou SW. (2010). Rhynchophylline down-regulates NR2B expression in cortex and hippocampal CA1 area of amphetamine-induced conditioned place rat preference. *Arch Pharm Res*. 33:557-565.

Ziegler J, Facchini PJ. (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu Rev Plant Biol*. 59:735-769.

10. Anexos

10.1 Curvas estándar para cuantificación

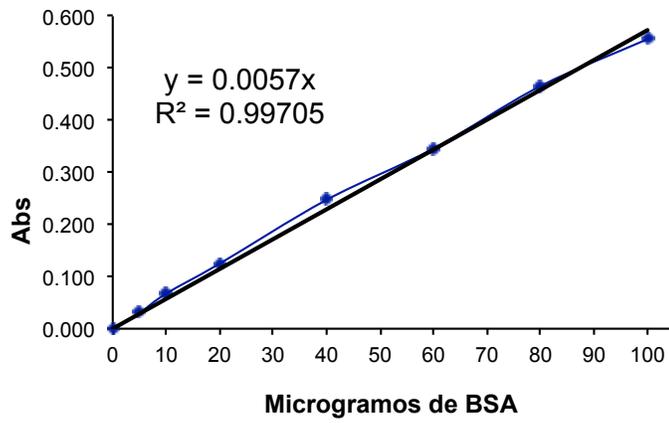


Figura 39. Curva estándar cuantificación Proteína Peterson.

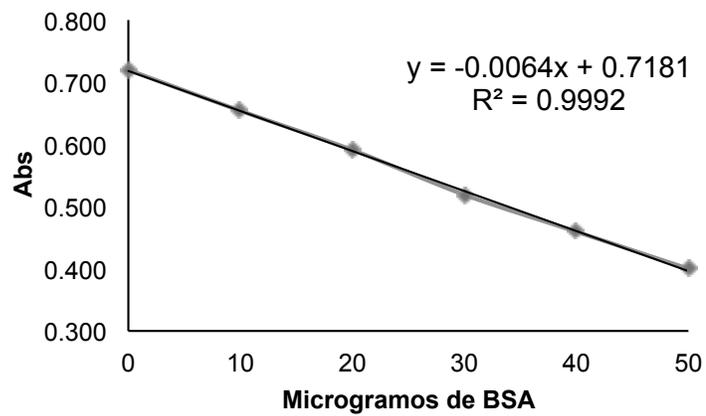


Figura 40. Curva estándar cuantificación Proteína 2D Quant-Kit

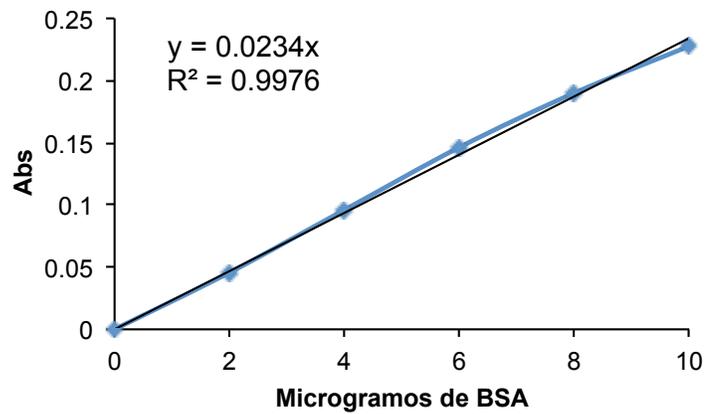


Figura 41. Curva estándar cuantificación Proteína Bradford.

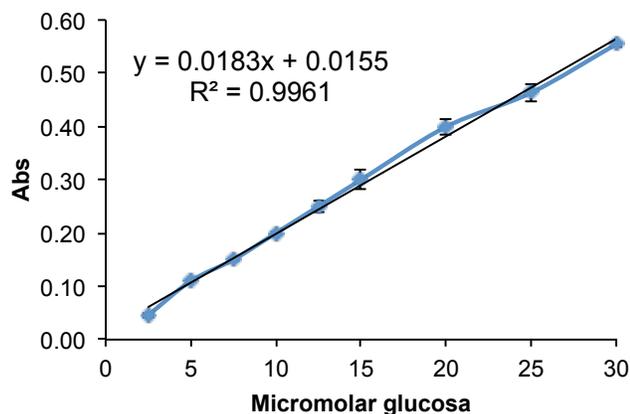


Figura 42. Curva estándar cuantificación glucosa Amplex Red.

10.2 Soluciones extracción RNA técnica de Lio *et al.*, 2004.

SI. Solución de extracción*

3%	Cetil Trimetil Bromuro de Amonio (CTAB) p/V
3%	Polivinilpirrolidona (PVP, 40 000) p/v
25 mM	EDTA
2 M	NaCl
100 mM	Tris pH 8.0
0.5 g/L	Espermidina
0.1 %	DEPC (v/v) a pH 8
4 %	β -mercaptoetanol (Se adiciona antes de usar)

* Se precalienta en baño maría a 65 °C.

SII. Solución de extracción

10 M	Cloruro de Litio
0.5 %	SDS (P/V)
0.1 %	DEPC (v/v) a pH 8

Todas las soluciones fueron incubadas con el DEPC toda la noche y fueron esterilizadas 2 veces.