

Revisión

Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica

Víctor M. Loyola-Vargas*, Patricia Sánchez-Iturbe, Blondy Canto-Canché, Luis C. Gutiérrez-Pacheco, Rosa M. Galaz-Ávalos y Oscar Moreno-Valenzuela

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yuc. Correo electrónico: vmyolya@cicy.mx. Tel. (999)-9813961, fax (999)-9813900

Recibido el 4 de noviembre del 2004; aceptado el 8 de enero del 2004

Resumen. Los alcaloides son uno de los grupos de metabolitos secundarios más diversos encontrados en los organismos vivos. Este grupo incluye alrededor de 12,000 productos, entre los cuales se encuentran los alcaloides indólicos, alcaloides derivados del triptófano que conforman alrededor de la cuarta parte de todos ellos. Los alcaloides se han reportado en varias familias vegetales, pero principalmente en las Apocinaceae, Loganiaceae y Rubiaceae, todas del orden Gentianales. Entre los alcaloides más importantes se tiene a los de tipo bisindólico como la vinblastina, utilizada en el tratamiento del mal de Hodgkin, y a la vincristina empleada en el tratamiento de la leucemia; además de los alcaloides monoterpén-indólicos ajmalicina y serpentina utilizados como agentes antihipertensivos contra las arritmias cardíacas y el mejoramiento de la circulación cerebral. La complejidad de los procesos genéticos, catalíticos y de transporte en la biosíntesis de los alcaloides monoterpén indólicos, es actualmente uno de los retos intelectuales más estimulantes en el área de los metabolitos secundarios. Si bien se requieren más de 50 pasos metabólicos para sintetizar los alcaloides más importantes producidos por *C. roseus*, hasta ahora solamente se han determinado y caracterizado, en algún grado, 20 de las enzimas requeridas. Faltan aún por elucidar un importante número de pasos metabólicos, para después purificar las correspondientes enzimas e intentar clonar sus genes. También es necesario elucidar los diversos aspectos de la regulación de la biosíntesis de los alcaloides, tanto en el nivel celular como en el molecular, pero sobre todo determinar cual es su función en las plantas que los producen. En esta revisión se presenta un análisis del estado actual que guarda el conocimiento en las rutas de biosíntesis de los alcaloides monoterpén-indólicos en *C. roseus*.

Palabras clave: *Catharanthus roseus*, alcaloide, biosíntesis, metabolitos secundarios.

Introducción

Los alcaloides son uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios encontrados en los organismos vivos. Si bien los alcaloides han sido aislados tradicionalmente de las plantas, de las cuales alrededor del 20% los contienen [1], actualmente se ha reportado la presencia de un número creciente de este tipo de metabolitos en animales, insectos, invertebrados marinos y microorganismos [2]. Una gran cantidad de alcaloides han sido empleados en la medicina, y muchos de ellos aún son prominentes fármacos hoy en día [3].

En el grupo de sustancias químicas conocidas como alcaloides, alrededor de unas 12,000 [1], se agrupan a una gran variedad de constituyentes químicos, por lo que estos metabolitos se han estructurado de acuerdo con su origen biogenético.

Abstract. Alkaloids are one of most diverse groups of secondary metabolites found in living organisms. This group includes around 12,000 products, among them we can find indole alkaloids, which are derived from tryptophan and comprise around 25% of all alkaloids. These types of alkaloids are present in several family plants, mainly Apocinaceae, Loganiaceae and Rubiaceae, all of them from the Gentiales order. The most economically important alkaloids are the bisindolics vinblastine, used for treating Hodgkin's disease, and vincristine, used for children's leukemia. Furthermore, the monoterpene alkaloids ajmalicine and serpentine are utilized as antihypertensive agents against cardiac arrhythmias and the improvement of the brain's blood circulation. The complexity of the genetic, catalytic and transport processes of the monoterpene indole alkaloid biosynthesis are actually one of the more stimulating intellectual challenges in plant secondary metabolism field. More than 50 metabolic steps are required to synthesize the most important alkaloids in *Catharanthus roseus*. Until now about only 20 of the 50 enzymes required for their biosynthesis have been determined and characterized. Hence, there is still an important number of enzymes that need to be characterized and genes to be isolated and cloned. It is also fundamental to elucidate the regulatory aspects of their biosynthesis, both at the cellular and the molecular level, in order to address the question of their function in the plants producing them. In this review, an analysis of the state of the art related to the biosynthesis of the monoterpene indole alkaloids is presented.

Keywords: *Catharanthus roseus*, alkaloid, biosynthesis, secondary metabolism.

Con base en esta clasificación se tienen cuatro grupos: 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 policétidos.

Entre los alcaloides derivados del triptófano se encuentran los alcaloides indólicos, mismos que pueden ser reagrupados en monoterpenos o indol terpenos (iridoides). Dentro del grupo de alcaloides indólicos existen numerosos subgrupos, los cuales dependen del modo de ciclización después de la remoción del residuo de glucosa de la estrictosidina (Figura 1). En este caso se pueden reconocer 8 subgrupos: corinante, aspidosperma, iboga, estricnano, plumerano, eburnano, valeciacontamano y aparcino [4].

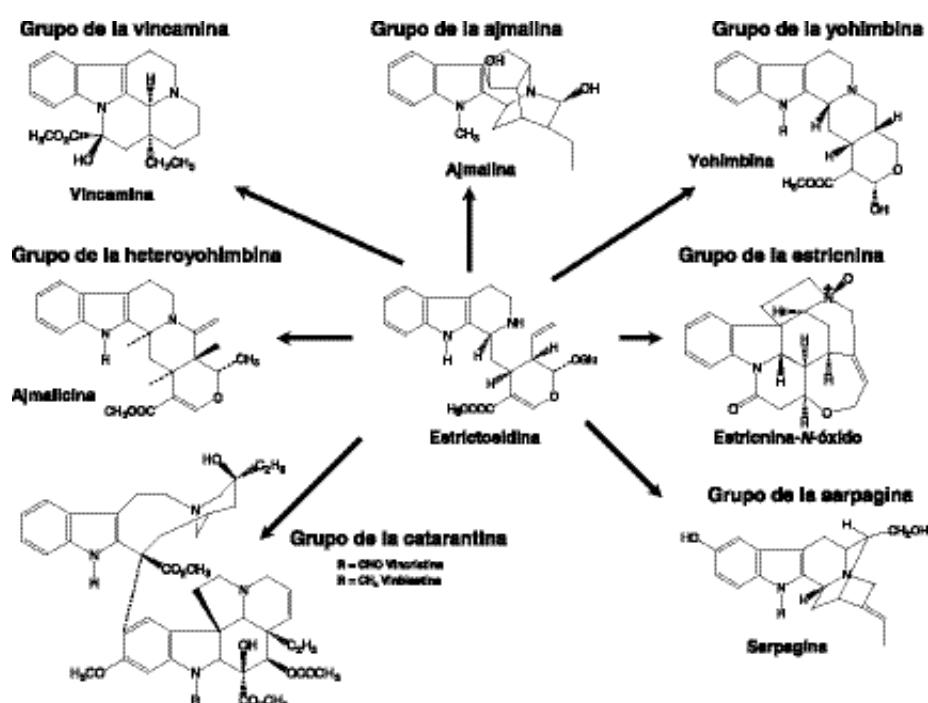


Fig. 1. Alcaloides indólicos sintetizados a partir de la estrictosidina [4, 5].

Alcaloides monoterpeno indólicos

Los alcaloides monoterpeno indólicos (AMIs) conforman una familia de más de 3,000 miembros, de los cuales sólo en algunos casos se conoce su efecto fisiológico en los mamíferos [6; 7]. Este tipo de alcaloides se han encontrado en varias familias vegetales, pero principalmente en las Apocinaceae, Loganiaceae, Nissaceae y Rubiaceae, todas del orden Gentianales. Entre las plantas más conocidas y estudiadas que producen AMIs se tienen a *Catharanthus roseus*, *Tabernaemontana divaricata* y *Rauvolfia serpentina* [8,9].

Catharanthus roseus

Catharanthus roseus (L.) G. Don, es una planta perenne de la familia de las Apocinaceas de distribución pantropical originaria de Madagascar, que ha sido cultivada con fines ornamentales gracias a que durante la mayor parte del año presenta flores de color rosa o blanco [10]. Esta planta ha sido usada en la medicina tradicional como agente hipoglucémico [11]; el interés por esta planta se debe a que sigue siendo una fuente importante de agentes quimioterapéuticos con actividad anticancerígena [3,10] y a que produce una gran variedad de AMIs [10,12], la mayoría de los cuales poseen actividad farmacológica. Entre los alcaloides más importantes producidos por *C. roseus* están los del tipo bisindólico que incluyen a la vinblastina, utilizada en el tratamiento del mal de Hodgkin [3], y a la vincristina empleada en el tratamiento de la leucemia [3]; esta planta también produce los agentes antihipertensivos ajmalicina y serpentina [13] utilizados contra las arrit-

mias cardíacas y el mejoramiento de la circulación cerebral [3; 14]. Actualmente el costo de la vinblastina en el mercado es de aproximadamente un millón de dólares por kilogramo; teniéndose una producción anual de 12 Kg. Por otra parte, la vincristina alcanza un costo de 3.5 millones de dólares por kilogramo y su producción anual es de 1 kilogramo. El alto costo de estos alcaloides se debe a que encuentran en concentraciones muy bajas en la planta (alrededor de 0.0005% PS) y su extracción se lleva a cabo en presencia de otros 200 alcaloides con propiedades químicas y físicas similares [15,16].

Esta problemática planteó la necesidad de encontrar fuentes alternas para la obtención de alcaloides bisindólicos. Al principio de la década de los ochentas se pensaba que el cultivo de tejidos vegetales podría ser la alternativa; sin embargo, hasta ahora, y después de un gran esfuerzo de investigación, los alcaloides de importancia farmacológica de *C. roseus* sólo han sido obtenidos en concentraciones muy bajas [12,14,17, 18]. Entre las principales causas de la falta de éxito para la obtención de alcaloides y otros productos de importancia económica a partir de cultivo de tejidos vegetales, se encuentra la falta de conocimiento de las vías de biosíntesis y degradación de estos productos.

Biosíntesis de AMIS

La biosíntesis de los AMIs producidos por *C. roseus* (Figura 2) es extremadamente compleja y requiere de la conjunción de dos vías metabólicas: la vía indólica y la vía terpénica [19,20].

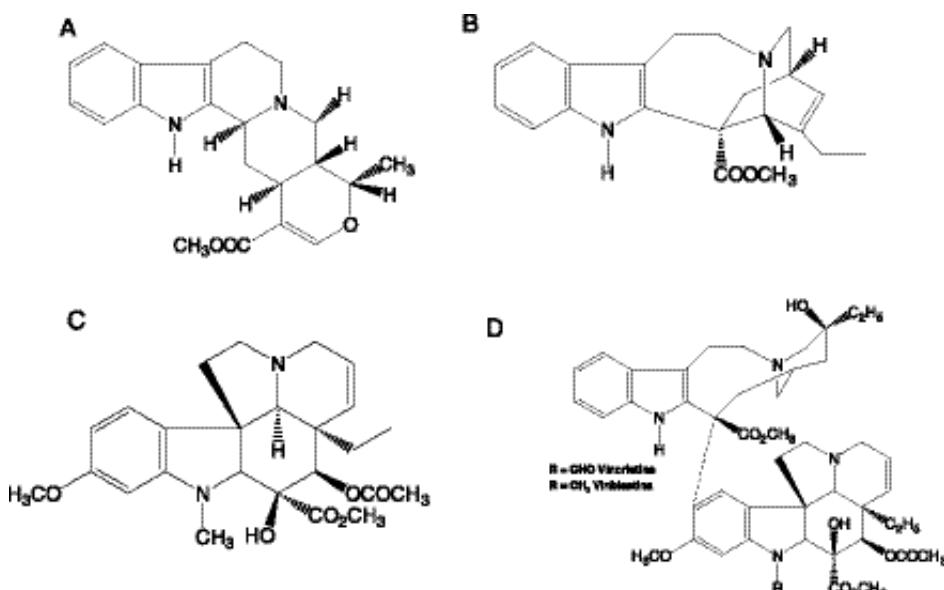


Fig. 2. Estructura de los AMIs: ajmalicina (A), catarantina (B), vindolina (C) alcaloides monoterpeno-indólicos y de los alcaloides bisindólicos vincristina (D, VCR) y vinblastina (D, VLB).

La enzima L-aminoácido-aromático carboxi-liasa (EC 4.1.1.28)¹ (nc = triptofano descarboxilasa) cataliza la conversión de L-triptofano a L-triptamina, el derivado indólico de los AMIs y de esta manera deriva triptofano hacia el metabolismo secundario. La triptamina y la secologanina, el precursor monoterpén-glucoíridoide, son condensados para formar estrictosidina, un glucoalcaloide precursor de todos los alcaloides aislados de *C. roseus*. La enzima que cataliza la condensación de la triptamina y de la secologanina es la 3- α (S)-estrictosidina triptamina-liasa (EC 4.3.3.2) (nc = estrictosidina sintasa).

Los precursores inmediatos de los AMIs, triptamina y secologanina, requieren a su vez precursores provenientes del metabolismo primario. En las plantas, al igual que en los animales y los microorganismos, los precursores de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptofano provienen de la vía metabólica del ácido shikímico [21,22].

Biosíntesis de secologanina

La vía del mevalonato que da lugar a la biosíntesis de la secologanina, es una ruta mucho más compleja y ramificada que la vía del ácido shikímico. Las plantas poseen dos rutas independientes de biosíntesis del isopentenil pirofosfato para la formación de isoprenoides que funcionan en compartimientos celulares diferentes: 1) la ruta clásica del acetato/mevalonato

para la biosíntesis de terpenoides en el citoplasma, y 2) la ruta de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato en los plástidos (Figura 3) [23,24].

La ruta metabólica del mevalonato está basada en las investigaciones realizadas sobre la biosíntesis de los esteroles, principalmente en mamíferos y levaduras [34]. En las plantas estos mecanismos son similares, sin embargo, la cantidad de productos finales que sintetizan los vegetales a partir de esta molécula, es mucho mayor.

La vía del mevalonato se inicia con la conjugación de dos moléculas de acetil-CoA por la acetil-CoA:acetil-CoA C-acetyltransferasa (EC 2.3.1.9) (nc = acetil-CoA C-acetyltransferasa) (Reacción 1, figura 3). En el siguiente paso la acetilo-CoA:acetoacetil-CoA C-acetyltransferasa (EC 2.3.3.10) (nc = hidroximetilglutaril-CoA sintasa) une al acetoacetil-CoA con otra molécula de acetil-CoA para formar la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (Reacción 2, figura 3), la cual es reducida a (*R*)-mevalonato por la enzima (*R*)-mevalonato:NADP oxidoreductasa-CoA (CoA-acetilante) (EC 1.1.1.34) (nc = hidroximetilglutaril-CoA reductasa, HMGR) (Reacción 3, figura 3). El (*R*)-mevalonato es fosforilado dos veces, primero por la ATP:(*R*)-mevalonato-5-fosfotransferasa (EC 2.7.1.36) (nc = mevalonato cinasa) (Reacción 4, figura 3) y luego por la ATP:(*R*)-5-fosfomevalonato fosfotransferasa (EC 2.7.4.2) (nc = fosfomevalonato cinasa) (Reacción 5, figura 3) para obtener (*R*)-5-difosfomevalonato. Por último, el (*R*)-5-difosfomevalonato es descarboxilado por la ATP:(*R*)-5-difosfomevalonato carboxilasa (deshidratante) (EC 4.1.1.33) (nc = difosfomevalonato descarboxilasa) a isopentenil pirofosfato (IPP) (Reacción 6, figura 3).

El IPP es convertido a su isómero reactivo el dimetilalil difosfato (DMAPP) por la isopentenil-difosfato Δ^3 - Δ^2 isomerasa (EC 5.3.3.2) (nc = isopentenil-difosfato Δ -isomerasa)

¹ La primera vez que se nombra una enzima se da el nombre sistemático y el número asignado por la Comisión de Enzimas (EC) de la IUBMB (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/) y entre paréntesis se da el nombre común; a partir de la segunda vez que se nombra la enzima, y en los pies de las figuras se utiliza el nombre común.

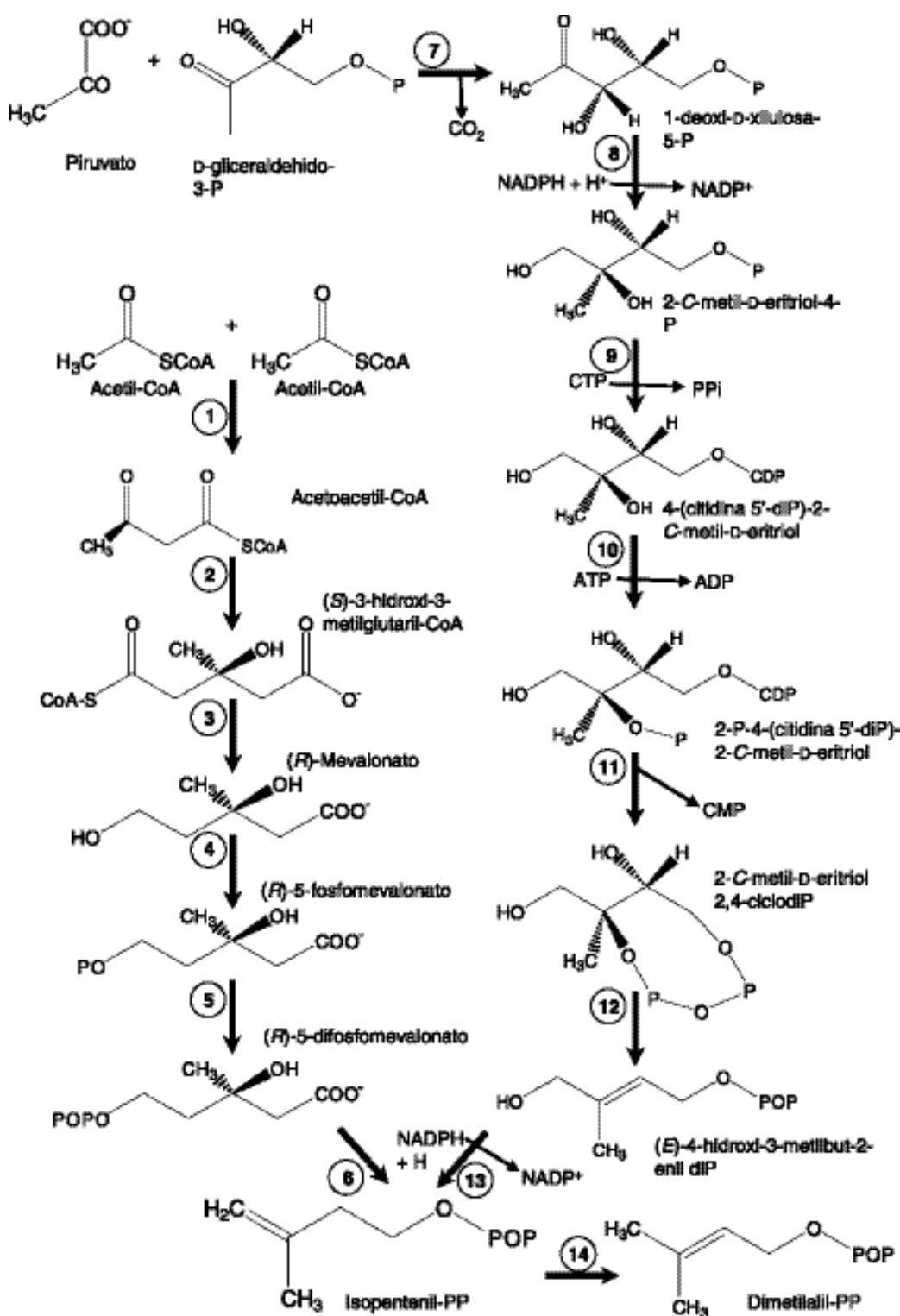


Fig. 3. Ruta para la biosíntesis del isopentenil pirofosfato (IPP). Los números dentro del círculo indican las enzimas: acetil-CoA C-acetiltransferasa (1); 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa (2); 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (3); mevalonato cinasa (4); 5-fosfomevalonato cinasa (5); difosfomevalonato descarboxilasa (6); 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (7); 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (8); 2-C-metil-D-eritriol 4-fosfato citidiltransferasa (9); 4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritriol cinasa (10); 2-C-metil-D-eritriol 2,4-ciclodifosfato sintasa (11); 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintasa (12); 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (13), isopentenil difosfato isomerasa (14) [23-33].

(Reacción 14, figura 3; reacción 1, figura 4). La condensación del DMAPP con una molécula de IPP es llevada a cabo por la dimetilalil-difosfato:isopentenil-difosfato dimetilalil*trans*-transferasa (EC 2.5.1.1) (nc = dimetilalil*trans* transferasa) (Reacción 2, figura 4) y genera el geranil-difosfato (GPP), iniciándose de esta forma la biosíntesis de los monoterpenos; posteriormente la geranil-difosfato:isopentenil-difosfato geranil*trans*transferasa (EC 2.5.1.10) (nc = geranil*trans*transferasa) cataliza la unión del GPP con una molécula de IPP y producir *trans*, *trans*-farnesil difosfato (Reacción 3, figura 4) y dirigirse a la biosíntesis de los sesquiterpenos, triterpenos, diterpenos, etc. [35] (Figura 4). A diferencia de los animales, en las plantas algunas de las enzimas descritas para esta parte de la ruta se encuentran formando complejos multienzimáticos; en rábano (*Raphanus sativus*) [36] y en *C. roseus* [37] se ha detectado la existencia de una enzima membranal que presenta la actividad de acetoacetil-CoA C-acetyltransferasa y de hidroximetilglutaril-CoA sintasa juntas.

Hasta principios de la década de los noventas se creía que todos los isoprenoides eran biosintetizados a partir de mevalonato [38-41] y que la enzima HMGR podría representar un paso limitante para la biosíntesis de los isoprenoides vegetales, como ocurre para la biosíntesis del colesterol en los animales [42]. También se pensaba que el IPP se biosintetizaba exclusivamente en el citosol y se metabolizaba allí mismo, o se transportaba a los plástidos. Sin embargo, Heintze *et al.* [43], observaron que los plástidos de trigo son capaces de bio-

sintetizar carotenos a partir de [¹⁴C]-acetato, lo que sugiere que en ellos también se lleva a cabo la biosíntesis de IPP. Como se creía que la HMGR tendría que estar involucrada (y ésta se localiza en el retículo endoplásmico) se propuso la existencia de una HMGR plastídica. Sin embargo, este no fue el caso, lo que se obtuvo fue una nueva ruta metabólica para la síntesis del IPP plastídico [44, 45].

La ruta de la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa, descubierta en *Escherichia coli* por Rohmer *et al.* [48], se inicia con la condensación entre el piruvato y el gliceraldehído-3-P para dar la 1-deoxi-D-xilulosa-5-P, en una reacción dependiente de tiamina y catalizada por la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (EC 2.2.1.7) [49] (Reacción 7, figura 3). Esta enzima fue aislada por primera vez en plantas de *Mentha x piperita* y tiene una masa molecular de 71 kDa [50]. En las plantas esta vía alterna de biosíntesis genera el IPP en los plástidos para la biosíntesis de isoprenoides, [25,27,49,50].

De acuerdo con Contin *et al.* [51], la secologanina proviene principalmente de la vía alterna de biosíntesis del IPP, aunque los datos de la literatura sugieren que la vía del mevalonato también participa en la biosíntesis de este monoterpeno, si bien en menor grado. En nuestro laboratorio hemos determinado que raíces transformadas de *C. roseus*, llevando la HMGR truncada de hámster sin el dominio por el cual se une a la membrana, son capaces de modificar la biosíntesis de alcaloides y de esteroles [52]. En el caso con menor actividad de la enzima soluble se obtuvo un aumento en la biosíntesis de

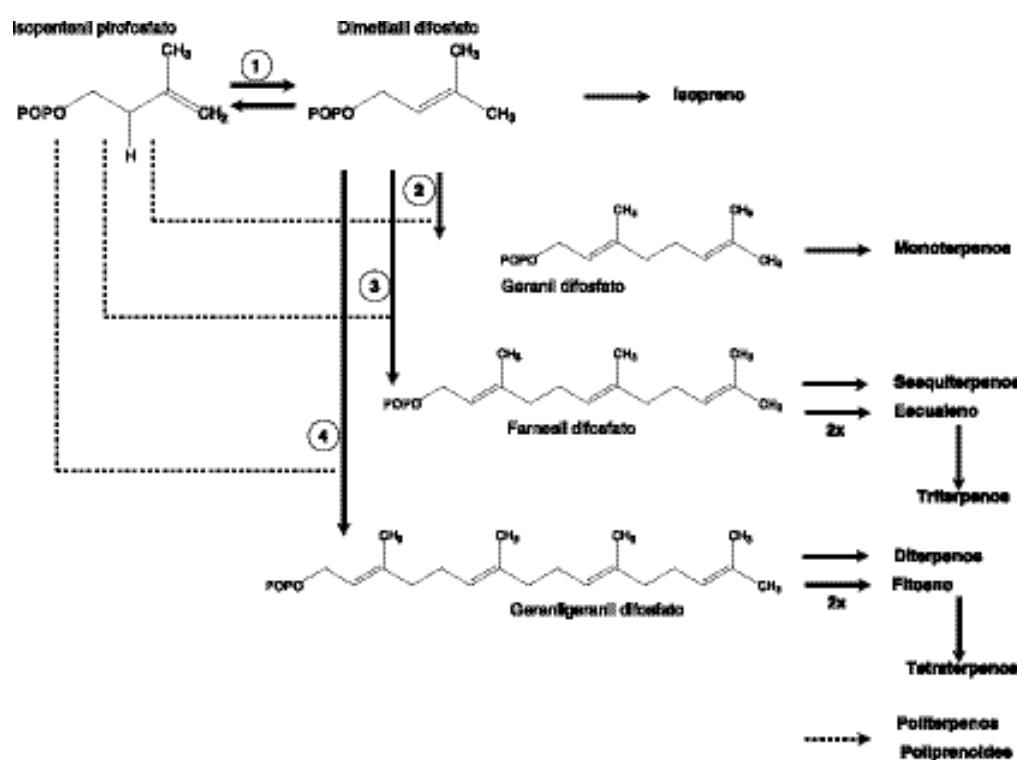


Fig. 4. Biosíntesis de isoprenoides. Los números dentro del círculo indican las enzimas: isopentenil-difosfato D-isomerasa (1), dimetilalil*trans*-transferasa (2); geranil*trans*transferasa (3); farnesil*trans*transferasa (4) [30,46,47].

ajmalicina y de catarantina al mismo tiempo que disminuyó la biosíntesis de campesterol. Cuando la actividad de la HMGR soluble fue máxima, no se detectó catarantina y los niveles de campesterol y serpentina aumentaron [52].

La coexistencia de ambas vías también se ha propuesto para la biosíntesis de otros terpenos como el β -caroteno, el fitol y la luteína en *C. roseus* [26] y para los sesquiterpenos de *Matricaria recutita* [25].

En *C. roseus* sólo se han determinado algunas de las enzimas que se requieren para la biosíntesis de la secologanina (Figura 5); las enzimas mejor conocidas son la HMGR (Reacción 3, figura 3), enzima que biosintetiza al mevalonato [12]; la geraniol 10-hidroxilasa (Reacción 3, figura 5), determinada, aislada y purificada de suspensiones celulares [53-55]; la enzima NADPH:citocromo P-450 reductasa, reconocida como un componente de la geraniol 10-hidroxilasa, fue purificada hasta homogeneidad por cromatografía de intercambio iónico [56]; una monoterpeno-alcohol oxido-reductasa no específica soluble que funciona en presencia de NAD(P)⁺ (Reacción 4, figura 5), capaz de catalizar la oxidación del 10-hidroxigeraniol a los correspondientes aldehídos [57].

Recientemente nuestro grupo ha sido capaz de determinar en raíces transformadas de *C. roseus* y utilizando el verdadero sustrato de la monoterpeno iridodial ciclasa, la enzima que cataliza la primera ciclización en la vía de biosíntesis de la secologanina (Reacción 5, figura 5) [58]. También se ha determinado a la (*S*)-adenosil-L-metionina-ácido logánico-metiltransferasa, en semillas de *C. roseus*; esta enzima cataliza la formación de loganina a partir de ácido logánico o del ácido secologánico y de la (*S*)-adenosil-L-metionina (Reacción 6, figura 5) [59]. Recientemente se ha determinado la secologanina sintasa (Reacción 7, figura 5), una proteína de la familia de las P450 [60, 61]. No todas las enzimas han sido purificadas y únicamente la geraniol 10-hidroxilasa se ha visto que es inhibida por uno de los alcaloides producidos por *C. roseus*, la catarantina.

En general se sabe muy poco sobre la biosíntesis de la secologanina. La ruta se ha postulado a partir de experimentos llevados a cabo con trazadores *in vivo* administrando glucosa, mevalonato, geraniol u otros precursores intermedios marcados con ³H o ¹⁴C. Para ello se han empleado suspensiones celulares de *C. roseus*, *Rawolfia serpentina*, *Gardenia jasminoides*, *Teucrium marum* y *Nepeta cataria*, así como plantas de diversas especies del género *Lonicera* [51]. El primer producto que compromete a los esqueletos hidrocarbonados hacia la biosíntesis del monoterpeno es el geraniol. Se ha propuesto que entre éste y la secologanina existen al menos 11 pasos enzimáticos, de las cuales únicamente se conocen seis: la geraniol 10-hidroxilasa (Reacción 3, figura 5), la NADP⁺:monoterpeno oxidorreductasa (Reacción 4, figura 5), la monoterpeno (iridodial) ciclasa (Reacción 5, figura 5), la 7-deoxiloganina, NADPH:oxígeno oxidorreductasa (7 α -hidrolasa) (EC 1.14.13.74) (Reacciones 6 y 8, figura 5), la (*S*)-adenosil-L-metionina:loganato 11-O-metiltransferasa (EC 2.1.1.50) (Reacciones 7 y 10, figura 5), la loganina:oxígeno oxidorreductasa (EC 1.3.3.9) (Reacciones 9 y 11, figura 5). La mayo-

ría de estas enzimas se han caracterizado de manera superficial por lo que se sabe poco sobre ellas.

Se ha propuesto que el primer paso de regulación en la biosíntesis de la secologanina se encuentra al nivel de la oxigenación del geraniol. La reacción es catalizada por la enzima geraniol 10-hidroxilasa (Reacción 3, figura 5) y se ha sugerido que esta enzima es la que compromete los esqueletos carbonados a la biosíntesis de la secologanina. Algunas observaciones que apoyan el hecho de que esta enzima pudiera representar un punto de control son: su actividad es inducida en condiciones en las que se produce un aumento en el contenido de alcaloides e, inversamente, la adición de fosfatos, que provoca una disminución en el contenido de alcaloides, inhibe su actividad [63]. Otras condiciones que provocan un aumento o una disminución en el contenido de alcaloides también correlacionan con la actividad de la geraniol 10-hidroxilasa [53], por lo que su papel parece fundamental para la biosíntesis de este tipo de metabolitos. Además, esta enzima es inhibida por la catarantina ($K_i=1$ mM) [64], lo cual pudiera tener un significado fisiológico al acumularse este alcaloide en el mismo organelo, e inhibirla por producto final [19].

Como se mencionó con anterioridad sólo se conocen algunas de las enzimas de la ruta de biosíntesis de la secologanina, a continuación se hace un análisis de las enzimas que mejor se conocen.

3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa. Mientras que en células animales y en levaduras participan dos enzimas en la biosíntesis de la hidroximetilglutaril-CoA [la acetil-CoA C-acetyltrans transferasa (EC 2.3.1.9) (Reacción 1, figura 3) y la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (EC 2.3.3.109 (Reacción 2, figura 3)], en las plantas parece ser que es una sola enzima la encargada de ambas reacciones. Aún cuando el equilibrio de la reacción de la tiolasa está orientado hacia la formación de la acetil-CoA, más que hacia la biosíntesis de la acetoacetil-CoA, la razón de lo anterior reside en el mecanismo de la reacción, pues incluye una condensación tipo Claisen, ya que una de las dos moléculas de acetil-CoA actúa como un carbánion que luego se adiciona nucleofílicamente sobre la otra molécula de acetil-CoA; si bien la eliminación del protón en el α metilo del acetilo, para convertirlo en carbánion, es energéticamente desfavorable, la reacción general de biosíntesis de la hidroximetilglutaril-CoA logra llevarse a cabo, de manera termodinámicamente favorable, debido a que la reacción de condensación aldólica, que realiza la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (Reacción 2, figura 3), se combina con la que realiza la Acetil-CoA C-acetyl transferasa (Reacción 1, figura 3) [65, 66].

La hidroximetilglutaril-CoA puede seguir tres caminos diferentes una vez que ha sido sintetizada: a) puede interactuar con la enzima hidroximetilglutaril-CoA liasa (EC 4.1.3.4), para contribuir a la formación de cuerpos cetónicos en las mitocondrias de las células animales (aunque se ha detectado su presencia en plantas [65, 67], aún no se conoce con certeza su papel dentro de la fisiología vegetal y permanece como un área no explorada), b) puede servir como sustrato de la 3-

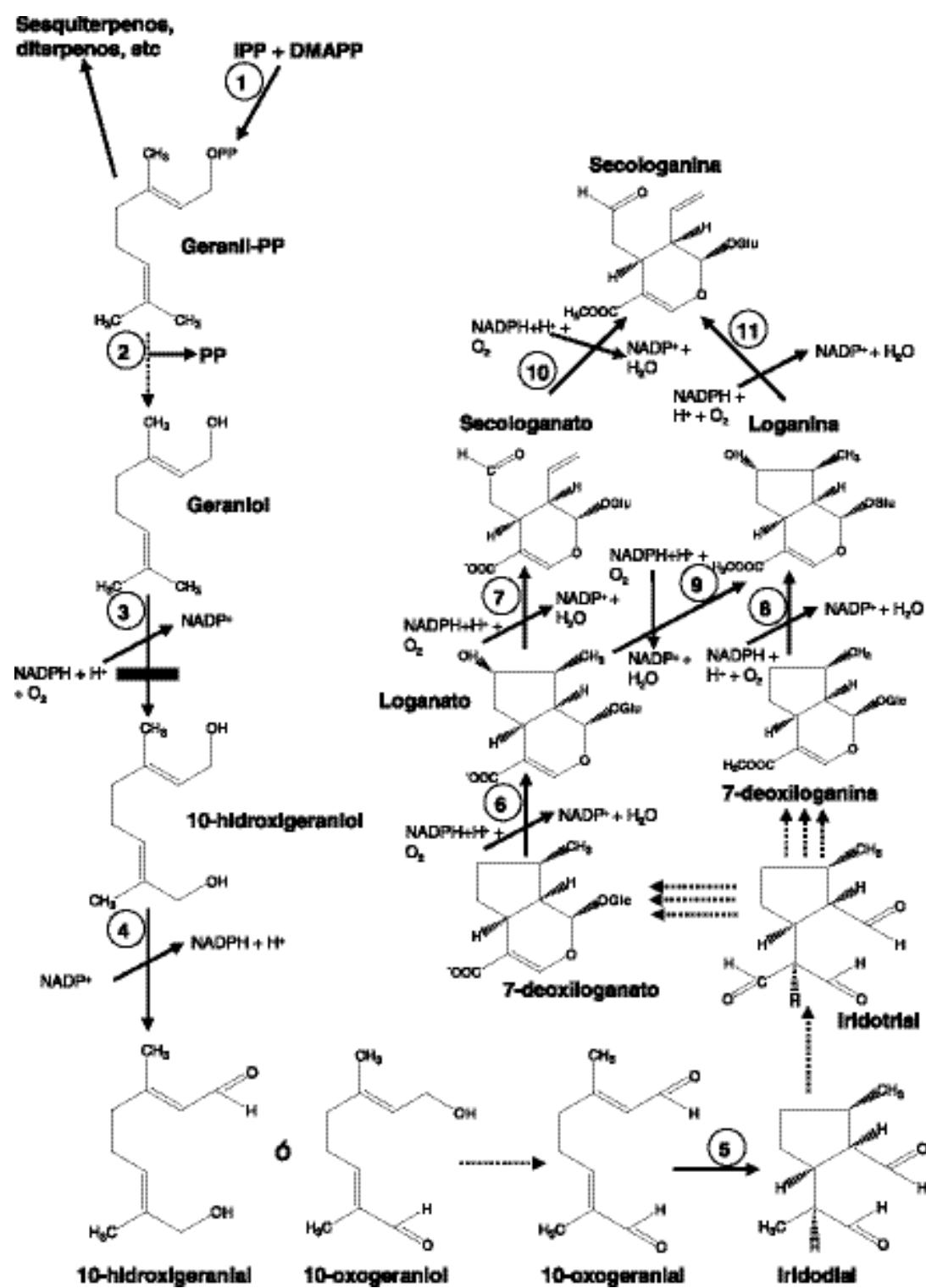


Fig. 5. Biosíntesis del monoterpeno iridoide secologanina. Los números encerrados en los círculos corresponden a las enzimas: geranol pirofosfato sintasa (1); fosfatasa (?) (2); geranol 10-hidroxilasa (3); NADP⁺: monoterpeno oxidoreductasa (4); monoterpeno (iridodial) ciclase (5); 7-deoxiloganina, NADPH:oxígeno oxidoreductasa (7 α -hidrolasa) (6 y 8); S-denosil-L-metionina:loganato 11-O-metiltransferasa (7 y 10); y loganina:oxígeno oxidoreductasa (9 y 11). Al principio de la vía se señala la posición de la fosfatasa específica para el geranil pirofosfato, propuesta por el grupo del Dr. R. Verpoorte [62], pero cuya existencia no ha podido ser demostrada hasta el momento. Las flechas punteadas indican pasos no caracterizados o probables. Varias flechas en el mismo paso indican que probablemente se trata de varios pasos metabólicos. ■ Paso inhibido por la catarantina. Diagrama basado en De Luca [20], Gershenson y Croteau [35] y Meijer [19].

metilglutaconil-CoA hidratasa (EC 4.2.1.18), para formar 3-hidroxi-3-metilglutaconato (reacción involucrada en el catabolismo de la leucina; la 3-metilglutaconil-CoA hidratasa ha sido purificada de hepatocitos de oveja y semipurificada de *C. roseus* [68]) y c) la HMGR (EC 1.1.1.34) puede convertirla en mevalonato con la ayuda del poder reductor de dos moléculas de NADPH.

La localización de la enzima se complica por el hecho de que el origen del IPP depende del tipo de tejido y del estadio de desarrollo, *e.g.*, un estudio con cloroplastos en desarrollo de cebada, demostró que mientras que los cloroplastos de tejidos juveniles son capaces de biosintetizar isopentenil pirofosfato, aquellos pertenecientes a tejidos de hoja madura, dependen de la importación de IPP desde el citosol [69]; por otro lado, en tricomas glandulares aislados de pimienta, la formación de isopentenil pirofosfato en el citosol es bloqueada a nivel de la HMGR en el momento en que la acumulación de aceite es más rápida, por lo que la biosíntesis de monoterpenos y sesquiterpenos recae exclusivamente en el isopentenil pirofosfato derivado de plástidos [70].

Se sabe que la biosíntesis de isoprenoides se reparte en tres compartimientos subcelulares semiautónomos: el citosol/retículo endoplásmico para la biosíntesis de sesquiterpenos y triterpenos; los plástidos para la biosíntesis de monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (así como para las porciones prenilo de la clorofila, las plastoquinonas y los tocoferoles); y la mitocondria (*y/o* el aparato de Golgi) para la biosíntesis de ubiquinona [66]. Para explicar los eventos anteriores se han propuesto recientemente una serie de modelos; en uno de ellos Chappell, sugiere que existen canales metabólicos regulados de manera independiente dedicados a la producción de tipos específicos de isoprenoides [41].

Mientras que en las células de los mamíferos la HMGR es una enzima codificada por un solo gen, en las plantas esta misma enzima se presenta como múltiples isoenzimas y es codificada por una pequeña familia de genes. Miembros específicos de esa familia de genes son expresados diferencialmente durante el desarrollo de la planta o en respuesta a factores ambientales y distintas isoformas de la enzima pueden ser críticas en la dirección de los intermediarios de la vía hacia isoprenoides específicos [41,71,72].

La HMGR de las plantas es una enzima que está estrechamente regulada por fitocromo (de manera post-transduccional) [73], fitohormonas, mecanismos de retroalimentación y factores proteícos endógenos [74]; además, existen evidencias de que la HMGR de plantas está regulada por fosforilación reversible, al parecer mediante una cascada de dos ciclos. De hecho ya se han encontrado algunas cinasas que actúan sobre la HMGR [75-79].

Chappell divide los mecanismos de regulación de la biosíntesis de isoprenos en finos y gruesos, y propone que el aumento en la transcripción de la enzima está mediado por una disminución de los oxiesterolos citosólicos que interactúan con factores en *trans*, y que éstos a su vez, se unen a los elementos reguladores de la biosíntesis de los esteroles, los cuales se encuentran en el promotor del gen de la HMGR [39].

A este respecto recientemente se encontró que el promotor del gen *Hmgr2* de jitomate, posee un elemento regulador positivo en el interior de la región 5'UTR y uno más que consiste en un rizo localizado corriente arriba del codón de inicio [80]. El incremento en la eficiencia traduccional del ARNm de la HMGR resulta, en parte, del procesamiento del ARNm de manera alternada, que se da en células sometidas a bajas concentraciones de mevalonato. Daraselia, también sugiere que el extremo amino terminal, el cual se encuentra insertado en la membrana, es el responsable de la regulación de la degradación de la enzima [80].

La HMGR de mamíferos se inactiva por una fosforilación reversible, que parece no estar relacionada con el mecanismo de control por retroalimentación pero si con la actividad de una cinasa dependiente de AMP [71]. Con respecto a las modificaciones post-traduccionales, en un estudio reciente se demostró que los metabolitos no esteroidales derivados del mevalonato y sintetizados entre el escualeno y el lanosterol, disminuyen la biosíntesis de la HMGR en células de hámster tratadas con lovastatina (un inhibidor de la HMGR), con TMD (4,4,10-β-trimetil-*trans*-decal-3β-ol, inhibidor de la escualeno ciclasa) y con mevalonato; y que la regulación se da en el nivel transduccional y por lo tanto aumenta la degradación de la enzima [81]. Se tienen evidencias de que los inhibidores de la HMGR provocan la aparición de mecanismos regulatorios presentes de manera implícita [81]. Lopez *et al.* [82], han demostrado que los inhibidores son capaces de revelar mecanismos de regulación transcripcional, controlados por el colesterol de la dieta, y mecanismos de degradación de la enzima controlados por el farnesol.

Hampton *et al.* [83], hacen una propuesta interesante estableciendo dos categorías para regular la actividad de la HMGR: a) inhibición por retroalimentación y b) regulación cruzada. La regulación por retroalimentación implica que la actividad de la enzima es reducida en respuesta a los productos provenientes de la vía del mevalonato. En mamíferos, por ejemplo, este tipo de regulación se logra a través de una modulación coordinada de la biosíntesis y degradación de la proteína; el dominio amino terminal que se ancla en la membrana es tanto necesario como suficiente para mediar la degradación regulada de la HMGR. Por otra parte, entre los mecanismos de regulación cruzada se tiene la fosforilación por una cinasa dependiente de AMP. Un estudio reciente sobre la regulación por fosforilación, en extractos de hoja de *Spinacea oleracea* L., demostró la capacidad de las proteín-cinasas para activar y desactivar, mediante fosforilación, tanto a la nitrato reductasa como a la HMGR1 de *Arabidopsis thaliana*. La proteín cinasa fosforiló más rápidamente a la HMGR1, haciéndolo además en la serina 577, y apoyando la propuesta hecha por Dale *et al.* [77], en el sentido de que este residuo es el punto de regulación de la fosforilación [79]. Este hallazgo traerá como consecuencia replanteamientos acerca de cómo se ven las interrelaciones entre la asimilación del nitrato y el metabolismo de la sacarosa y de los isoprenoides. Mientras que en los mamíferos las citocinas aumentan los niveles de ARNm de la HMGR; en las plantas el daño causado por patógenos dispara,

la mayoría de las veces, la inducción de algunas isoenzimas de la HMGR y la represión de otras [84]. También se sabe que las isoenzimas de HMGR están reguladas por desarrollo como sucede en jitomate, en el cual las isoenzimas son sintetizadas en tejidos específicos [85]. El mismo evento se ha observado en tubérculos de *Solanum tuberosum* L., en donde los miembros de la familia de la HMGR se expresan, de acuerdo al estadio de desarrollo, mediante la producción de isoformas específicas para la biosíntesis de productos finales diferentes en tejidos particulares [86]. En resumen, la regulación de la HMGR se da a cuatro niveles: en la transcripción, en la traducción de su ARNm, en la modificación covalente por fosforilación y en la degradación de la enzima.

La HMGR ha demostrado ser una enzima difícil de purificar. Sólo ha sido purificada de *Hevea brasiliensis* [87], *S. tuberosum* [88], *R. sativus* [89], *Zea mays* [90] y *A. thaliana* [77]; y se ha semipurificado de *Parthenium argentatum* [91], *N. cataria* [92], y *C. roseus* [93,94].

Bach *et al.* [89], establecieron una metodología para purificar HMGR basada en la extracción de la enzima por medio de detergentes, utilizando membranas aisladas a partir de plántulas etioladas de *R. sativus*. La enzima fue caracterizada molecular y cinéticamente y se determinó que tiene una masa molecular de 180 kDa, con 4 subunidades de 45 kDa cada una y que se trata de una proteína ligeramente ácida, con un *pI* de 5.9. Por otro lado Kondo y Oba [88], desarrollaron una metodología para purificar HMGR a partir de *S. tuberosum*, logrando solubilizar la enzima utilizando la digestión con tripsina en lugar de detergentes y obteniendo un porcentaje de recuperación del 1.8%, con una actividad específica de 7,910 nmoles de mevalonato formados min^{-1} mg de prot $^{-1}$ e identificando que la enzima está constituida por dos subunidades de 55 kDa y una masa molecular total de 110 kDa. En tanto que las HMGR de aves y mamíferos presentan estructuras monoméricas de entre 90 y 97 kDa [95], en *Pseudomonas mevalonii* [96] y levaduras la enzima es tetramérica con una masa molecular de 260 a 280 kDa [97, 98].

Se han determinado diferentes valores de K_m para la hidroximetilglutaril-CoA, tanto para la fracción membranal como para la fracción citosólica en semillas de *Pisum sativum*; para la primera se determinó un valor de 0.385 μM y de 80 μM para la segunda, lo que sugiere la existencia de isoenzimas en la célula [99]. El valor de 27 μM de la K_m para el NADPH y de 1.5 μM para la K_m de la hidroximetilglutaril-CoA de la HMGR en *R. sativus* es ligeramente menor que el determinado para la enzima de mamíferos y levaduras [100]. Una afinidad elevada hacia el NADPH, como se ha visto en *R. sativus*, podría permitir la regulación de la actividad de HMGR *in vivo* a través de un cambio rápido en la relación NADP $^+$ /NADPH [89].

Recientemente Dale *et al.* [77], lograron expresar en *E. coli*, en una forma catalíticamente activa, el dominio catalítico de la HMGR1 de *A. thaliana* y lo purificaron. La alta eficiencia del sistema de expresión bacteriano, aunado a la simplicidad del protocolo de purificación, resultó en la obtención de

grandes cantidades de la enzima pura (cerca de 5 mg L $^{-1}$ de cultivo), con una actividad específica final de 17 U mg prot $^{-1}$; lo anterior, expresado en pkat mg prot $^{-1}$, da un valor de 2.82×10^8 , siendo ésta la actividad específica más elevada reportada hasta la fecha para cualquier HMGR purificada a partir de tejidos vegetales. Los valores de las K_m para el NADPH y la hidroximetilglutaril-CoA fueron de $71 \pm 7 \mu\text{M}$ y $8.3 \pm 1.5 \mu\text{M}$, respectivamente. En este mismo modelo se comprobó que la HMGR1 de *A. thaliana* es inactivada por fosforilación en la serina 577. Por otra parte, Galaz-Ávalos detectó dos picos de actividad al eluir extractos de raíces transformadas de *C. roseus* a través de una columna de intercambio aniónico. Estos componentes presentan actividades específicas de 284.61 y 210.58 pkat mg prot $^{-1}$ y poseen una masa molecular cercana a los 200 kDa [93].

Geraniol 10-hidroxilasa. La geraniol 10-hidroxilasa es una monooxigenasa de la familia de las proteínas P450 [101] y se encuentra localizada en las membranas de las vacuolas [102]. Esta enzima cataliza la hidroxilación del geraniol en la posición 10 y requiere O $_2$ y NADPH (Reacción 3, figura 5) [101]. Los electrones del NADPH son transferidos al grupo hemo de la monooxigenasa a través de la NADPH: citocromo P450 reductasa [103]. Esta flavoproteína es absolutamente necesaria para que la monooxigenasa realice su catálisis y está formada por dos componentes: la citocromo P-450 reductasa NADPH dependiente y el citocromo P-450, con actividad propia de geraniol 10-hidroxilasa [104]. El primer componente es una flavoproteína membranal que ha sido purificada a homogeneidad, su masa molecular es de aproximadamente 78 kDa y tiene como cofactores al FMN y al FAD [56, 57, 102, 105]. El segundo componente es una proteína de masa molecular de 56 kDa que ha sido purificada aparentemente a homogeneidad; acepta únicamente como sustrato al geraniol y no al geraniol-P o al nerol-P, lo cual podría considerarse como evidencia de que existe una desfosforilación previa durante la ruta metabólica [53]. Esta enzima tiene como inhibidor no competitivo reversible a la catarantina ($K_i = 1 \text{ mM}$), es estimulada por DTT y es inhibida por CO, aunque esta inhibición es revertida por la luz [57, 101, 105]. El ADNc de la citocromo P-450 reductasa que codifica para un péptido de 78.9 kDa, ha sido clonado empleando como sonda regiones altamente conservadas entre estas proteínas [104]; sin embargo, cuando este ADNc se empleó para transformar *Nicotiana tabacum* y *A. thaliana*, la proteína se expresó pero no se detectó actividad de geraniol 10-hidroxilasa. Los anticuerpos generados contra la proteína que codifica el ADNc cruzaron con la proteína purificada por la Meijer [106].

Monoterpeno acíclico de alcoholes primarios: NADP $^+$ oxidoreductasa. Se ha establecido que esta enzima juega un importante papel en la biosíntesis de la secologanina [18], y cataliza la oxidación reversible del 10-hidroxigeraniol en presencia de NADP $^+$, para producir 10-oxogeraniol ó 10-hidroxigeraniol (Reacción 4, figura 5); al parecer ésta es una enzima

inespecífica en cuanto al grupo OH que es capaz de oxidar [107]. Se ha purificado de células de *R. serpentina*, su masa molecular es de 44 kDa y su *pI* es de 5.4. Es inactivada por iodoacetamida y por N-etilmaleimida, lo que sugiere que requiere de grupos SH para su actividad [108]. El valor de la K_m para el NADP⁺ y el NADPH es de 25 y 5.5 μM respectivamente, teniendo nerol (oxidación) o neral (reducción) como sustrato. Esta enzima no utiliza NAD⁺ ni NADH como cofactores y puede aceptar alcoholes alílicos primarios con cadenas mayores a seis carbonos como sustratos; sin embargo, no acepta alcoholes secundarios, ni etanol [18].

Monoterpén (iridodial) ciclasa. Esta enzima cataliza la reacción de formación de iridodial a partir de 10-oxogeranial y utiliza NADPH como agente reductor (Reacción 5, figura 5). Esta enzima ha sido semipurificada 440 veces de *R. serpentina* [107, 109] y parece ser un homotetrámero con una masa molecular de 118 kDa y un pH óptimo de 7.0. Nuestro grupo la ha semipurificado de raíces transformadas de *C. roseus* [58].

7-deoxi:loganina, NADPH:oxígeno oxidoreductasa [7α-hidroxilante] (EC 1.14.13.74). Esta enzima cataliza puede utilizar como sustrato tanto al 7-deoxiloganato como a la 7-deoxiloganina (Reacciones 6 y 8, figura 5). La reacción es inhibida por mjonóxido de carbono, así como por diversos inhibidores de las proteínas citocromo P450, indicando que esta enzima pertenece a la familia de los citocromos P450. La K_m para la 7-deoxiloganina y el NADPH es de 170 y 18 μM respectivamente [110].

Loganina:oxígeno oxidoreductasa (EC 1.3.3.9). Esta enzima cataliza el último paso de la biosíntesis de secologanina a partir de loganina, que involucra una ruptura oxidativa del anillo del metilciclopentano de la loganina (Reacción 11, figura 5). La enzima también reconoce como sustrato al ácido logánico (Reacción 7, figura 5). Es un miembro de la familia de proteínas citocromo P450 y se encuentra presente en la fracción microsomal de suspensiones celulares de *C. roseus*, así como en la epidermis de sus hojas [60]. También ha sido determinada en suspensiones celulares de *Lonicera japonica* [61, 111].

S-adenosil-L-metionina:loganato 11-O-metiltransferasa (EC 2.1.1.50). Esta enzima cataliza la O-metilación del grupo carbonilo del ácido logánico. Puede catalizar la transferencia del grupo metilo de la (S)-adenosil-L-metionina indistintamente al ácido logánico (Reacción 9, figura 5) o al ácido secologánico (Reacción 10, figura 5), pero no acepta al ácido 7-desoxilogánico como sustrato; lo anterior indica que en la vía de biosíntesis de la secologanina, la hidroxilación antecede a la metilación. Esta enzima ha sido purificada parcialmente a partir de plántulas etioladas de *C. roseus*; los valores de K_m para la (S)-adenosil-L-metionina y para el ácido logánico son de 0.06 y 12.5 mM, respectivamente [19].

Biosíntesis de los AMIs

La mayoría de las investigaciones realizadas para caracterizar a las enzimas de la ruta de biosíntesis de los AMIs se han llevado a cabo tomando en cuenta la enorme complejidad de la ruta. Para una revisión profunda sobre el tema se puede recurrir a las excelentes revisiones que sobre el tema han realizado De Luca [1,20] y Meijer *et al.* [19]. La lista de las enzimas que han sido estudiadas en menor o mayor grado incluye a la triptofano decarboxilasa, la geraniol 10-hidroxilasa, la NADPH-citocromo P450 reductasa, la oxidoreductasa de NADP⁺-dependiente, la monoterpén (iridodial) ciclasa, la secologanina sintasa, la SAM-loganato O-metiltransferasa, la 7-deoxiloganina 7-hidroxilasa, la estrictosidina sintasa, la estrictosidina-β-D-glucosidasa, la catenamina reductasa, la tabersonina 16-hidroxilasa, la S-adenosil-L-metionina:16-hidroxitabersonina-16-O-metiltransferasa, la S-adenosil-L-metionina:16-metoxi 2, 3-dihidro-3-hidroxitabersonina-N-metiltransferasa, la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa, la acetilCoA:4-O-desacetilvindolina-4-O-acetyltransferasa, la tabersonina 17-hidroxilasa y la minovincinina 19-O-acetyltransferasa (Tabla 1).

El precursor indólico triptamina se sintetiza a partir del triptofano (Reacción 1, figura 6), en una reacción catalizada por la enzima L-aminoácido aromático carboxi-liasa (EC 4.1.1.28) (Nombre común: triptofano decarboxilasa, TDC) que emplea como cofactor al piridoxal fosfato; esta reacción también puede emplear como sustrato al 5-hidroxitriptofano. Los dos precursores, la secologanina y la triptamina, son condensadas para producir la estrictosidina-O-glucosa, en una reacción catalizada por la 3-α (*S*)-estrictosidina triptaminilasa (EC 4.3.3.2) (Nombre común: estrictosidina sintasa, SS) (Reacción 2, figura 6) [112]; el producto de esta reacción, la 3-α (*S*) estrictosidina, es desglucosilado por la estrictosidina β-D-glucuronidasa (EC 3.2.1.105) para formar finalmente la molécula de estrictosidina aglica (Reacción 3, figura 6), precursor de los aproximadamente 200 alcaloides indólicos de *C. roseus*, incluyendo a la vindolina y la catarantina [113, 114]. La estrictosidina aglica se convierte en 4,21-didehidrogeissoschizina, en forma espontánea, la cual puede ser transformada en catenamina, precursor directo de la ajmalicina y la serpentina [115], o puede ser reducida enzimáticamente a geissoschizina (Reacción 4, figura 6).

Por catalizar pasos cruciales de la biosíntesis de los AMIs, las enzimas TDC y SS han sido ampliamente estudiadas [118,119]. La TDC se ha purificado tanto de células en suspensión [120] como de raíces transformadas de *C. roseus* [121]. La TDC es una enzima citoplásica formada por dos subunidades idénticas de 55 kDa, tiene una masa molecular aproximada de 110 kDa, un *pI* de 5.9, un pH óptimo de 8.5 y es modulada por diversos factores; se ha determinado que la actividad de la TDC aumenta en cultivos de *C. roseus* como respuesta a la adición de homogenizados hongos [122] o de enzimas hidrolíticas [123]. En el primer caso, se sabe que el aumento de su actividad se debe al incremento en la transcripción del gen y en la traducción del mensajero.

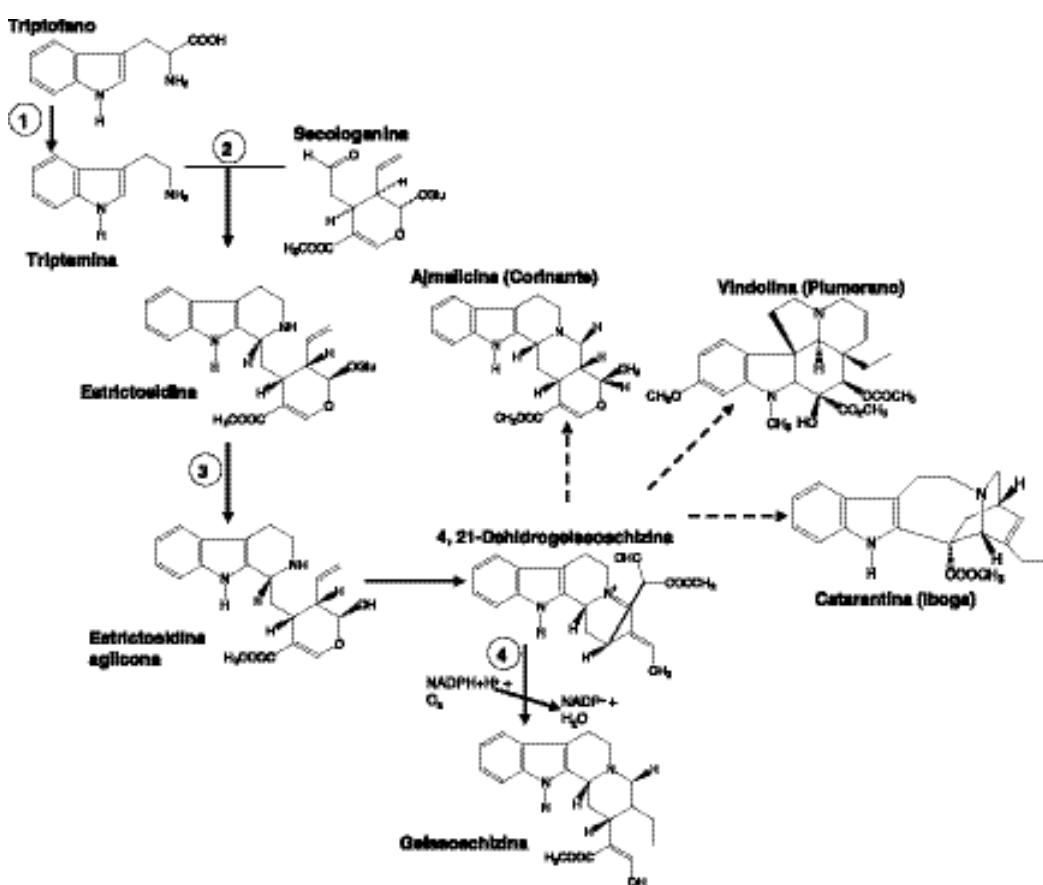


Fig. 6. Biosíntesis de la estrictosidina, precursor universal de los alcaloides monoterpeno-indólicos. Los números indican la posición en la vía de las enzimas: Triptofano decarboxilasa (1); estrictosidina sintasa (2); estrictosidina glucosidasa (3); geissoschizina deshidrogenasa (4). Las flechas cortadas indican varios pasos metabólicos [19; 20; 116; 117].

Por otra parte, contrario al efecto del homogenizado fúngico, las auxinas provocan represión de la expresión de la TDC [124].

El valor de K_m para triptófano de la TDC es de 75 μM y de 13 μM para el 5-hidroxitriptófano; el D-triptófano resulta ser un inhibidor no competitivo y la triptamina (producto de la reacción) es un inhibidor competitivo [121,125].

La TDC, además de estar regulada por factores externos (ataques fúngicos, etc.) está también sujeta a regulación tejido específica y por desarrollo. En plántulas de *C. roseus* provenientes de semillas germinadas *in vitro*, bajo condiciones de oscuridad, su actividad es transitoria; comienza a detectarse a los 3 días, alcanza su máximo a los 5 días y luego declina [126]. En general en las plántulas, su actividad es mayor en las partes aéreas (siendo mayor en hojas jóvenes que en las maduras); mientras que en la planta adulta su actividad es mayor en las raíces [122].

A pesar de que la TDC deriva el triptófano al metabolismo secundario, la sobre-expresión del gen de la TDC en *C. roseus* no conlleva a una mayor producción de AMIs, a pesar de que ocurre un aumento en la cantidad de la proteína con actividad de TDC y en la producción de triptamina [14]. La

sobresíntesis de triptamina, ya sea por medios bioquímicos o moleculares, no se ve reflejada en una mayor biosíntesis de alcaloides [12,19,127]. Este resultado sugiere que la enzima TDC no es el único punto de regulación en la biosíntesis de estos metabolitos, confirmándose lo anterior en múltiples trabajos realizados con células en suspensión [128-130]. Por otra parte, y como era de esperarse, la actividad de la TDC puede disminuir sin afectar el contenido total de los AMIs. Moreno-Valenzuela et al. [131], desdiferenciaron un cultivo de raíces transformadas a células en suspensión, y posteriormente las rediferenciaron a raíces. Durante este proceso la actividad de la TDC se vio dramáticamente alterada. En el paso de raíces a células, la actividad de la TDC disminuyó en un orden de magnitud o más y los AMIs disminuyeron de 10 a 2 mg g⁻¹ PS durante este proceso. En las raíces rediferenciadas se encontró un nivel de actividad de TDC similar a la detectada en las células en suspensión, en tanto que la producción de los alcaloides se recuperó hasta en un 90% respecto a la producción inicial. Estos datos sugieren que no se requieren niveles elevados de actividad de TDC para producir a los AMIs. Este resultado ha sido recientemente comprobado empleando cultivos transgénicos que sobreexpresan la actividad de TDC [132].

Tabla 1. Enzimas caracterizadas en la ruta de biosíntesis de los AMIs en *Catharanthus roseus* y *Rauvolfia serpentina*. Modificado de Mejier et al., [19]. AH = aparente homogeneidad; P = parcial; Pur = purificación. Los espacios vacíos indican que dichos parámetros no han sido determinados. Las referencias se citan a lo largo del texto.

Enzima	Abreviatura	MM × 10 ⁻³	Sustratos y K_m^*	Localización	Pur	Clonación	Tejido
Triptofano decarboxilasa	TDC	56	Trp 75 μM	Citoplasma	AH	Sí	Epidermis hojas>raíz <i>C. roseus</i>
Geraniol 10-hidroxilasa	G10OH	56, 63	Geraniol 5.5 μM	Membrana vacuola	AH	Sí	Plántulas <i>C. roseus</i>
NADPH: citocromo P-450 reductasa		79	Citocromo P-450 ^a	Membrana vacuola	AH	Sí	Plántulas <i>C. roseus</i>
Monoterpeno iridodial ciclase	MIC		10 oxogeranial; NADPH	¿Vacuola?	P		Raíces transformadas <i>C. roseus</i> y <i>R. serpentina</i>
SAM: ácido logánico metil transferasa	LAMT		SAM 0.06 mM; ácido logánico 12.5 mM		P		Plántulas <i>C. roseus</i>
7-deoxiloganina 7-hidroxilasa	DL7H		O ₂ , NADPH 18 μM, 7-deoxiloganina 170 μM	Microsomas		Sí	Cultivo de tejidos <i>L. japonica</i> y <i>C. roseus</i>
Secologanina sintasa	SS		O ₂ , NADPH, loganina	Retículo endoplásmico		Sí	Hoja <i>C. roseus</i> y cultivo de tejidos <i>L. japonica</i>
Estrictosidina sintasa	ES	39	Triptamina 0.9 – 2 mM; 5.8 mM; secologanina 30 μM ^b ; 2.6 mM	Vacuola	AH	Sí	Epidermis hojas, yemas florales, cultivo de tejidos <i>C. roseus</i> y <i>R. serpentina</i>
Estrictosidina β-D-glucosidasa	SG	63; 230; 450	Estrictosidina 0.1 – 0.2 mM	Retículo endoplásmico	AH	Sí	Hoja>raíz>tallo>flor Cultivo de tejidos <i>C. roseus</i> y <i>R. serpentina</i>
Geissoschizina deshidrogenasa	GD		Geissoschizina 83 μM, NADP ⁺ 77 nM		35x		Cultivo de tejidos <i>C. roseus</i>
Polineuridina aldehído esterasa	PNAE		Aldehído de polineuridina		AH	Sí	Cultivo de tejidos <i>R. serpentina</i>
Catenamina sintasa	CS		4, 21-geissoschizina Catenamina				
Catenamina reductasa	CR						
Tetrahidroalstonina sintasa		81	Catenamina imonium 62 μM				P
Peroxidasa		15	Catenamina + vindolinina	Vacuola			P

Peroxidasa		37	Ajmalicina	Vacuola	P
Tabersonina 16-hidroxilasa	T16OH		O ₂ , NADPH 14 μ M y tabersonina 11 μ M	Retículo endoplásmico	Hojas jóvenes y cultivo de tejidos <i>C. roseus</i>
SAM 16-hidroxitabersonina O-metil-transferasa	OMT		16-hidroxitabersonina	Retículo endoplásmico	Plántulas <i>C. roseus</i>
SAM: 16-metoxi-2, 3-dihidro-3-hidroxitabersonina-N-metil-t transferasa	NMT		16-metoxi-2, 3-dihidro-3-hidroxitabersonina	Membranas de los tilacoides	Plántulas <i>C. roseus</i>
Deacetoxivindolina 4-hidroxilasa	D4H	45	O ₂ , 2-oxoglutarato Desacetivilindolina	Citoplasma	Idioblastos/latidíferas hoja, tallo y flores <i>C. roseus</i>
AcetylCoA: deacetivilindolina 4-O-acetyl-transferasa	DAT	54 (33+22)	AcetylCoA 6.5 μ M Deacetivilindolina 1.3 μ M	Citoplasma	Idioblastos/latidíferas hoja, tallo y flores <i>C. roseus</i>
Minovincinina 19-O-acetyltransferasa	MAT		Minovincinina	Células corticales raíz <i>C. roseus</i>	
Anhidrovinblastina sintasa (peroxidasa)		45	Vindolina y catarantina	Vacuola	Cultivo de tejidos <i>C. roseus</i>
Vinorina sintasa	VS	31	16- <i>epi</i> -vellosimina 19.4 μ M Acetyl-CoA 64 μ M	AH	Cultivo de tejidos <i>R. serpenina</i>
Vomilenina reductasa	VR	43	Vomilenina y NADPH		Cultivo de tejidos <i>R. serpenina</i>
Vinorina hidroxilasa	VH		O ₂ , NADPH 3 μ M, vinorina 26 μ M	Microsomal	Cultivo de tejidos <i>R. serpenina</i>

* En el caso de que se presenten varios valores para la K_m , se refiere al hecho de que éstos han sido determinados por diferentes autores.

^a En ensayos *in vitro* también puede reducir al sustrato artificial citocromo c (K_m 7.8 μ M) con NADPH (K_m 5.7 μ M) como el donador de electrones.

^b El valor de K_m de 30 μ M es para todas las isoenzimas [140]

Se ha aislado y caracterizado una clona genómica de la TDC a partir del genoma de *C. roseus*. El gen para esta enzima se encuentra presente en una sola copia [133]. La cuantificación de los niveles de TDC en plántulas y en suspensiones celulares muestran que tanto la expresión del gen como la actividad enzimática son inducibles en forma transiente, sugiriendo que la actividad de la TDC está regulada en los nivel transcripcional, traduccional y postraduccional [122, 130,134,135].

La otra enzima, la SS, cataliza la condensación estereoespecífica de la secologanina con la triptamina para producir la 3- α (S)-estrictosidina. La enzima es altamente específica para sus dos sustratos, *i. e.* no acepta al ácido secologánico ni al triptófano como sustratos, pero muestra una ligera actividad con análogos sustituidos en las posiciones 5, 6 o 7 de la triptamina. Hasta ahora no se tienen indicios de que esta enzima sea inhibida por alguno de los alcaloides, productos finales de esta ruta metabólica [136-138].

La SS fue purificada a finales de los setentas y se caracterizó como una enzima soluble de masa molecular entre 35 y 38 kDa [138]. Diez años más tarde se reportó la identificación de cuatro diferentes formas de SS en células en suspensión y hojas de *C. roseus* [139]. Recientemente, De Waal *et al.* [140], determinaron que el número de SSs es mayor; estos investigadores purificaron seis diferentes SSs, distinguibles por electroforesis empleando geles de alta concentración (20% de acrilamida). En *C. roseus* se han detectado siete isoenzimas de la SS, cuatro de las cuales pueden ser separadas por sus actividades catalíticas (diferente valor de K_m) y por su pI (entre 4.3 y 4.8). Pfizer y Zenk [139], sugieren que por tratarse de una enzima glucosilada hay diferencias entre isoenzimas en la cadena hidrocarbonada. Por otra parte, se tienen evidencias de que la ocurrencia de isoformas no está relacionada con el estadio de desarrollo ni con alguna regulación tejido-específica, ya que se encontró que las isoformas se expresan tanto en células en suspensión, como en hojas, tallos y raíces [140]. Estos datos sugieren que las diferentes isoformas se deben a glucosilaciones de la proteína original, aunque no se han caracterizado los tipos de carbohidratos presentes [140]. Hasta el momento no se conocen las funciones, en la planta, de las diferentes isoformas de SS.

A diferencia de la TDC que muestra regulación tejido específica, la SS presenta niveles de actividad similares en los diferentes órganos de la planta [126], y su actividad no se altera cuando los cultivos *in vitro* de *C. roseus* son transferidos al “medio de producción de alcaloides” (8% de sacarosa) [134]. Esta enzima tampoco parece estar regulada por el proceso de desarrollo [126], por lo que parecía no estar sujeta a mecanismos de regulación. Sin embargo, durante el proceso descrito por Moreno-Valenzuela *et al.* [131], sobre la desdiferenciación-rediferenciación de raíces transformadas de *C. roseus*, la actividad de la SS disminuyó en un 60% cuando las raíces se desdiferenciaron a células en suspensión. La actividad de la SS sólo se recuperó a la mitad, en tanto que el patrón de isoformas cambió, cuando las células se rediferenciaron a raíces,

por lo que no es claro aún si esta enzima es regulada por el proceso de desarrollo [131].

Existen evidencias que sugieren que la SS no constituye un paso limitante en la biosíntesis de los alcaloides indólicos en plántulas de *C. roseus*; se ha encontrado que al transferir un cultivo de células en suspensión de *C. roseus*, de un medio de mantenimiento a uno de inducción para producir alcaloides, el aumento en la acumulación de alcaloides no correlaciona con un incremento en la actividad de la SS; sin embargo, en callos de *C. roseus* transformados con el gen de la SS se observó una correlación directa entre el aumento de la actividad enzimática y la acumulación de alcaloides [141,142]. Resultados similares se han obtenido en *Cinchona ledgeriana* [143,144] y en plántulas de *C. roseus* [144]. Lo anterior sugiere la posibilidad de que la SS es un punto de regulación de esta ruta metabólica; sin embargo, la información es poco precisa y en ocasiones contradictoria, lo cual pone en duda la necesidad de profundizar en las investigaciones que permitan establecer su papel real en la biosíntesis de los AMIs.

La SS es codificada por un solo gen, sugiriendo que las isoformas son el resultado de modificaciones postransduccionales de un precursor simple [145, 146]; esta enzima fue la primera del metabolismo de los AMIs en ser clonada, primero de *R. serpentina* [147] y luego de *C. roseus* [145]. El mensajero para la SS presenta una región que codifica para un péptido señal de 31 aminoácidos que la dirige a la vacuola [122], lo cual apoya diversos ensayos que sugieren que se trata de una enzima vacuolar [119,148].

Doireau *et al.* [149], y Stevens *et al.* [150], han medido la actividad de la TDC y de la SS, así como las concentraciones de triptamina en cultivos de células de *C. roseus* y de otras especies. Estos autores observaron que existe una acumulación de triptamina a pesar de haber una elevada actividad de SS; estos resultados apoyan la hipótesis de que la limitante para la biosíntesis de estrictosidina y sus múltiples derivados es el contenido del precursor terpéptido secologanina. Los resultados de nuestro grupo de trabajo [131], también sugieren que los principales puntos de regulación para la producción de la estrictosidina se ubican en alguna(s) enzima(s) que participan en la biosíntesis de la secologanina.

Biosíntesis de los primeros AMIS

Después de la síntesis de estrictosidina el siguiente paso en la biosíntesis de los AMIs es la desglucosilación de la estrictosidina por la estrictosidina β -D-glucohidrolasa (EC 3.2.1.105) para producir estrictosidina-aglicona (Reacción 3, figura 6), un producto inestable que después de varios rearrreglos, los cuales no se conocen con precisión, se convierte en 4,21-didehidrogeissoschizina, la cual a su vez es reducida a geissoschizina por la geissoschizina: NADP⁺ 4,21 oxidoreductasa (EC 1.3.1.36) (Reacción 4, figura 6) [151].

La estrictosidina β -D-glucohidrolasa es una glucoproteína localizada en el retículo endoplásmico [7]; es altamente espe-

cífica para la estrictosidina o su derivado 10-metoxi y en su forma nativa parece encontrarse en forma de agregados, en los cuales cada subunidad de 63 kDa se une a las otras por interacciones hidrofóbicas [152].

Se ha demostrado que la estrictosidina β -D-glucuronidasa se encuentra codificada por un solo gen que ha sido clonado recientemente y se expresa en diferentes niveles en flores, tallos, hojas y raíces, lo que sugiere una regulación tejido específica; además, la actividad enzimática cuantificada en cada órgano es proporcional al nivel de ARNm detectado [7]. Su expresión es inducida por metil jasmonato (MeJa) y en los cultivos que acumulan AMIs la actividad de esta enzima es elevada [150], de ahí que se le considere un paso clave en la biosíntesis de estos compuestos.

Por otra parte la información sobre la geissoschizina: NADP 4,21 oxidoreductasa es escasa, sólo se tiene el reporte de una purificación parcial a partir de células en suspensión de *C. roseus* y en comparación con otras enzimas de esta vía su actividad específica es muy baja [151].

A partir de la 4, 21-didehidrogeissoschizina la ruta de biosíntesis que lleva a la biosíntesis de ajmalicina, catarantina y tabersonina se encuentra poco documentada.

La ruta biosintética hacia la producción de ajmalicina comienza cuando la 4, 21-didehidrogeissoschizina es convertida en catenamina (Reacción 1, figura 7) por la catenamina sintasa [19]. La catenamina es reducida a ajmalicina por la catenamina reductasa (Reacción 2, figura 7). Las enzimas involucradas en esta parte de la vía se han estudiado muy poco y sólo se sabe que la catenamina reductasa es dependiente de NADPH [153]. Hasta ahora se han separado dos isoenzimas, una de las cuales interviene en la biosíntesis de la ajmalicina y la otra convierte la forma iminium de la catenamina en tetrahidroalstonina [19]. Se desconoce como se regulan estas dos enzimas.

La catenamina reductasa (Reacción 2, figura 7) que cataliza la reducción de la catenamina a ajmalicina, tiene un pH óptimo de 6.6 y una masa molecular de 81 kDa. La caracterización de la enzima tetrahidroalstonina sintasa (Reacción 4,

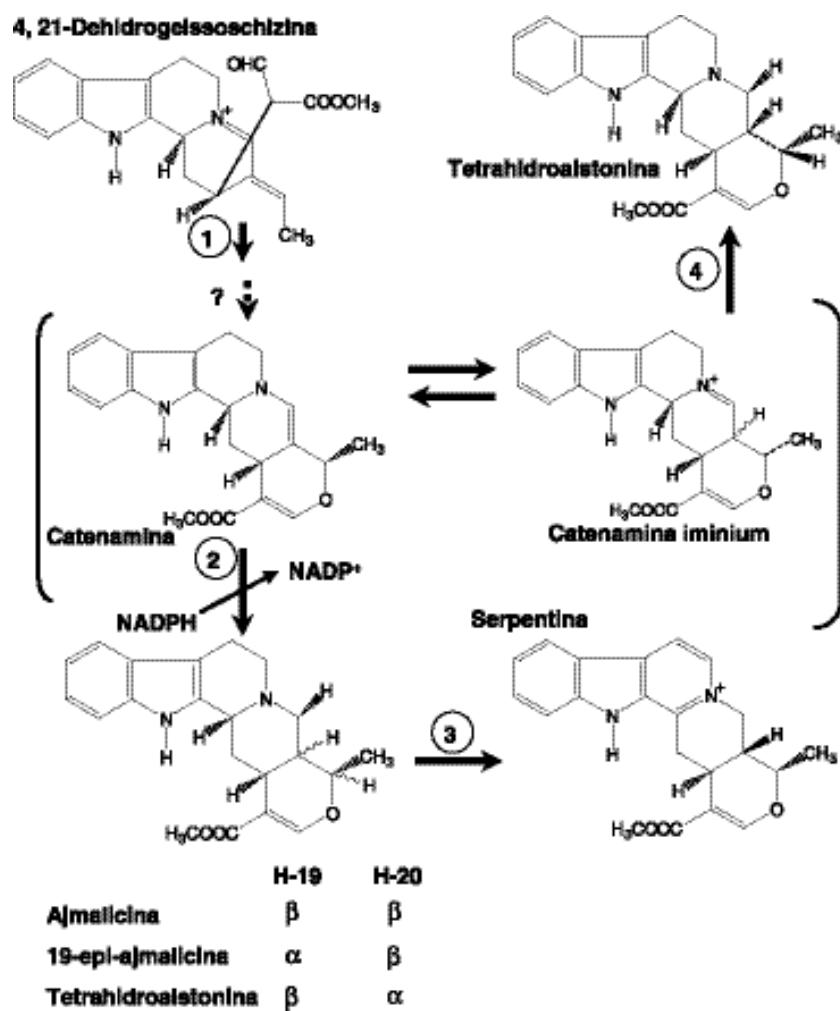


Fig. 7. Biosíntesis de la ajmalicina y serpentina. Los números encerrados en un círculo corresponden a las enzimas: catenamina sintasa (1), catenamina reductasa (2); peroxidasa inespecífica (3), y tetrahidroalstonina sintasa (4). Las flechas cortadas indican varios pasos metabólicos. Existe la posibilidad de que la ruta no inicie con la 4,21-dehidrogeissoschizina, si no que inicie con la 20,21-aldehido de dehidrocorinanteina. [5,116,117].

figura 7), la cual cataliza la formación de tetrahidrolstonina a partir de la forma iminium de la catenamina, muestra que ambas enzimas poseen el mismo pH óptimo y la misma masa molecular. La forma parcialmente purificada de la tetrahidroalstonina sintasa muestra una K_m de 62 μM para la catenamina y utiliza al NADPH pero no al NADH como cofactor [154].

La ajmalicina es oxidada a serpentina por peroxidases básicas que se encuentran dentro de las vacuolas [155] y se sabe que su producción está fuertemente influenciada por la luz [156]. Hasta ahora no se han purificado estas peroxidases básicas y tampoco se tienen datos sobre su especificidad, pues la ajmalicina en presencia de peroxidasa de rábano es oxidada a serpentina. Aparentemente esta conversión permite a las células vegetales mantener la ajmalicina almacenada dentro la vacuola. En células en suspensión de *C. roseus* la oxidación de la ajmalicina parece estar regulada por luz, pues en su presencia los cultivos producen una gran cantidad de serpentina mientras que los cultivados en oscuridad sólo acumulan ajmalicina [155,156].

De Luca [20], ha sugerido que la reducción de la geissoschizina por la geissoschizina NADP⁺ 4,21 oxidoreductasa es reversible (Reacción 4, figura 6) y que la ramificación de la vía puede ocurrir a partir de una modificación diferente a la ciclización de la catenamina, este último producto se reduce para formar ajmalicina, en tanto que la forma iminium también se reduce para formar tetrahidroalstonina (Reacción 4, figura 7) [154].

Mientras que la catarantina se ha detectado en la mayoría de los cultivos *in vitro* [157-160], la vindolina hasta hace poco tiempo sólo se había determinado en el nivel de trazas [161,

162]. Recientemente se ha reportado la selección de una línea de callos de *C. roseus* capaz de acumular hasta 0.45 mg⁻¹ g PS de vindolina en cultivos de callos incubados con luz [163].

La biosíntesis y acumulación de vindolina está asociada a la luz y al estadio de desarrollo de la planta y en tanto que la expresión de las enzimas para su biosíntesis es órgano-específica [1, 20, 118, 126, 135, 164-169].

La 4, 21-didehidrogeissschizina representa también el precursor de inicio de biosíntesis de la ajmalina, esta es una molécula altamente compleja y que contiene nueve carbonos quirales [170]. La biosíntesis de la ajmalina involucra cerca de 10 pasos enzimáticos (Figura 8). El primer paso metabólico que deriva 4,21-didehidrogeissschizina a la biosíntesis de ajmalina es la oxidación de este compuesto a geissoschizina, en una reacción catalizada por la geissoschizina deshidrogenasa (EC 1.3.1.36) (Reacción 1, figura 8), la cual adiciona, de forma estereoespífica, un hidrógeno en el carbono 21 en la posición α . La enzima ha sido purificada 35 veces de suspensiones celulares de *C. roseus*; la enzima requiere de un pH óptimo de 7.6 y el valor de su K_m para geissoschizina y para NADP⁺ es de 83 μM y 77 nM, respectivamente [151].

La polineuridina aldehído esterasa (EC 3.1.1.78) cataliza la conversión del aldehído polinueridina a 16-*epi*-vellosimina (Reacción 3, figura 8) [170]. Produce un precursor inmediato para la biosíntesis del esqueleto ajmalano que conduce a la biosíntesis de ajmalina; esta enzima ha sido purificada recientemente 423 veces a homogeneidad a partir de suspensiones celulares de *R. serpentina*, posee una masa molecular de 30 kDa y un *pI* de 5.9; ha sido clonada mediante el escrutinio de una biblioteca de ADNc. La enzima pura tiene una actividad

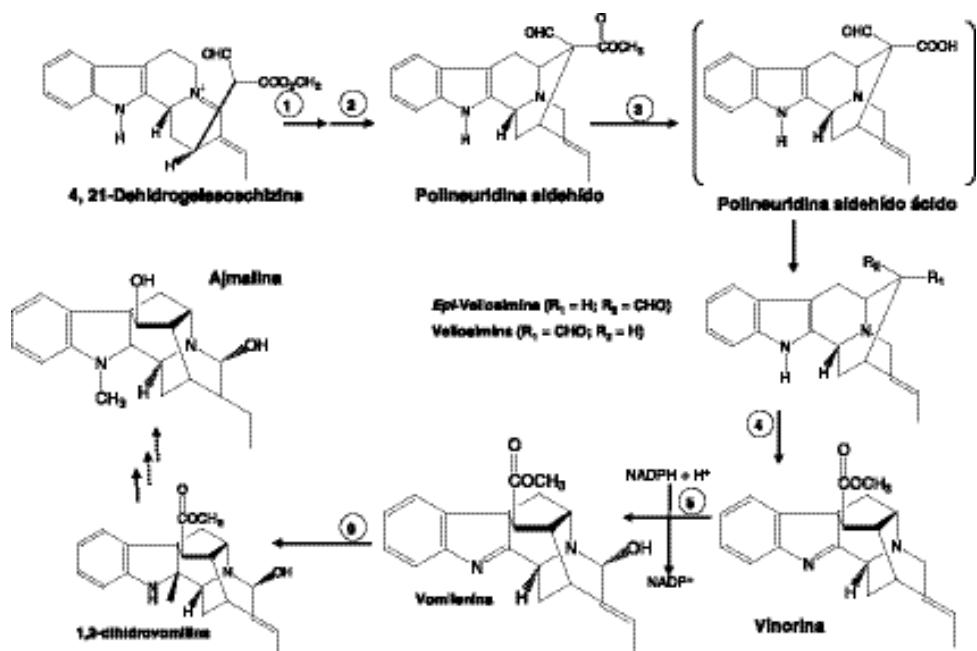


Fig. 8. Biosíntesis de la ajmalina. Los números encerrados en un círculo corresponden a las enzimas: geissoschizina deshidrogenasa (1), vomilenina reductasa (2), polineuridina aldehído esterasa (3), vinorina sintasa (4), vinorina hidroxilasa (5); 1,2-dihidrovomileno:NADP⁺ oxidoreductasa (6). Las flechas punteadas indican que no se conocen las enzimas que catalizan dicha transformación. Varias flechas indican varios pasos metabólicos [170,171].

específica de 160.8 nkat mg prot.⁻¹, es altamente específica para la polineuridina aldehido como sustrato para el cual tiene una *Km* de 0.83 mM y pertenece a la familia de las α/β -hidrolasas [170].

El siguiente paso en la ruta de biosíntesis de la ajmalina, es la biosíntesis de vinorina y es catalizada por la acil-CoA:16-epivellosimina *O*-acetiltransferasa (ciclizante) (nombre común: vinorina sintasa) (EC 2.3.1.160) (Reacción 4, figura 8). Esta enzima ha sido purificada 160 veces de suspensiones celulares de *R. serpentina*. Entre sus propiedades más interesantes se encuentra su elevado pH (8.5) y temperatura óptima 35°C, un *pI* de 4.4 y una masa molecular de 31 kDa. La *Km* para sus sustratos 16-*epi*-vellosimina y acetil-CoA es de 19.4 y 64 μ M, respectivamente, y al igual que otras enzimas de la ruta de biosíntesis de la ajmalina es altamente específica para sus sustratos [172].

La vinorina es hidroxilada a vomilenina por la vinorina, NADPH:oxígeno oxidoreductasa (21 α -hidrolizante)(EC 1.14.13.75) (Reacción 5, figura 8). La enzima es completamente dependiente de NADPH y oxígeno molecular, se encuentra localizada en la fracción microsomal y es inhibida por los inhibidores típicos de las proteínas citocromo P450, por lo que seguramente se trata de una citocromo P450 monooxygenasa. La enzima tiene un pH óptimo de 8.3 y su *Km* para el NADPH y la vinorina es de 3 y 26 μ M, respectivamente [173].

El último paso conocido de la biosíntesis de ajmalina es la saturación del doble enlace de la indolmina de la vomilenina en forma estereoespecífica para producir la 2 β (*R*)-1,2-dihidrovomilenina por medio de la 1,2-dihidrovomilenina:NADP⁺ oxidoreductasa (EC 1.5.1.32) (Reacción 6, figura 8). La enzi-

ma que cataliza la reacción de reducción es dependiente de NADPH y ha sido aislada recientemente de suspensiones celulares de *R. serpentina*; tiene una masa molecular de 43 kDa [171].

Biosíntesis de catarantina y tabersonina

La biosíntesis de la catarantina así como la de la tabersonina inicia en el 20, 21-aldehido de dehidrocorinanteína y procede posiblemente vía catenamina to estemmadenina y dehidroescodina, el precursor de los alcaloides con esqueletos *iboga* o *Aspidosperma* (Figura 9) [116]. No se conoce nada acerca de la naturaleza de las enzimas involucradas en la conversión de la catenamina a catarantina y tabersonina.

Biosíntesis de vindolina

Las suspensiones celulares de *C. roseus* poseen la capacidad de sintetizar catarantina y tabersonina [14,17] y de transformar tabersonina en 16-metoxitabersonina [174] pero no poseen la actividad enzimática necesaria para la biosíntesis de vindolina [118;164;175]. Por esta razón una gran cantidad de trabajos se han canalizado al estudio de las enzimas y los mecanismos de regulación involucrados en la biosíntesis de vindolina.

Vázquez-Flota *et al.* [176], han determinado que cultivos de raíces transformadas retados con MeJa aumentan la producción de catarantina. Estos resultados sugieren que probablemente algunas de las enzimas que están participando en la

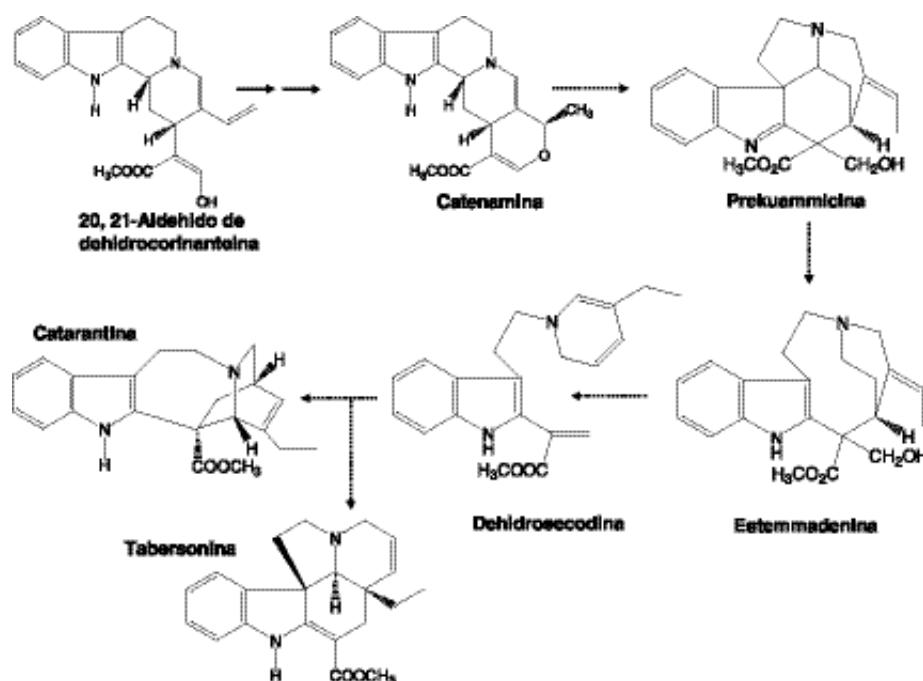


Fig. 9. Biosíntesis de la catarantina y tabersonina. Las flechas punteadas indican pasos metabólicos y enzimas desconocidas. Las flechas continuas varios pasos metabólicos [116].

biosíntesis de este alcaloide estén sujetas a regulación y pueden ser utilizados para el estudio de la ruta de biosíntesis de la catarantina (Figura 9).

La biosíntesis de vindolina a partir de la tabersonina consta de seis pasos enzimáticos (Figura 10) catalizados por la tabersonina NADPH:oxígeno oxidoreductasa (16-hidroxilante) (EC 1.14.13.73) (nombre común: tabersonina 16-hidroxilasa), la S-adenosil-L-metionina:11-O-dimetil-17-O-deacetilvindolina 11-O-metiltransferasa (EC 2.1.1.94) (nombre común: 11-O-dimetil-17-O-deacetilvindolina O-metiltransferasa), una hidroxilasa no caracterizada, la S-adenosil-L-metionina:16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina N-metiltransferasa (EC 2.1.1.99) (nombre común: 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina N-metiltransferasa), la desacetoxivindolina,2-oxoglutarato:oxígeno oxidoreductasa (4β-hidroxilante (EC 1.14.11.20) (nombre común: desacetoxivindolina-4-hidroxilasa), y la acetylCoA:17-O-deacetilvindolina 17-O-acetyltransferasa (EC 2.3.1.107) (nombre común: 17-O-deacetilvindolina O-acetyltransferasa) [118,135,164,168,169,174,175,177,178].

Los resultados reportados sugieren que la ruta de biosíntesis de la vindolina está regulada por los procesos de desarrollo y restringida a las partes aéreas de la planta adulta, principalmente en hojas jóvenes y en los cotiledones, pues es en estos tejidos en los que se han detectado los mayores niveles de ARNm y la actividad más elevada de estas enzimas (Figura 12) [164,174,179]. Esta presencia va disminuyendo con la edad y con el tipo de órgano, siendo ya poco preponderante en hojas adultas, tallos, raíces y yemas florales. En cultivos celu-

lares de *C. roseus* se ha detectado actividad de tabersonina 16-hidroxilasa y de 11-O-dimetil-17-O-deacetilvindolina O-metiltransferasa pero no de 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina N-metiltransferasa, desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-deacetilvindolina O-acetyltransferasa [118,167,174].

La regulación de esta vía ocurre por medio de un mecanismo complejo y a diferentes niveles. Esta regulación comprende desde factores que afectan la presencia de estas enzimas en los niveles transcripcional, post-transcripcional y post-traduccional, hasta su localización dentro de la célula, del tipo de célula y, como se mencionó con anterioridad, la edad del tejido.

En plántulas de *C. roseus* se ha reportado que las enzimas tabersonina 16-hidroxilasa, (16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina N-metiltransferasa, desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-desacetilvindolina O-acetyltransferasa, alcanzan su máxima actividad seis días después de la imbibición [135]. Cuando estas plántulas son tratadas con luz, las enzimas tabersonina 16-hidroxilasa y desacetoxivindolina-4-hidroxilasa aumentan su actividad seis veces, en tanto que la 17-O-desacetilvindolina-17-O-acetyltransferasa lo hacen 10 veces [126, 174,175]. Este efecto de la luz sobre la actividad de las enzimas desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-desacetilvindolina-17-O-acetyltransferasa, es mediado por fitocromo ya que son activadas por un pulso de luz roja (660 nm) y esta activación es revertida por un pulso de luz roja lejana (710 nm) [183,184]. La 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina-N-

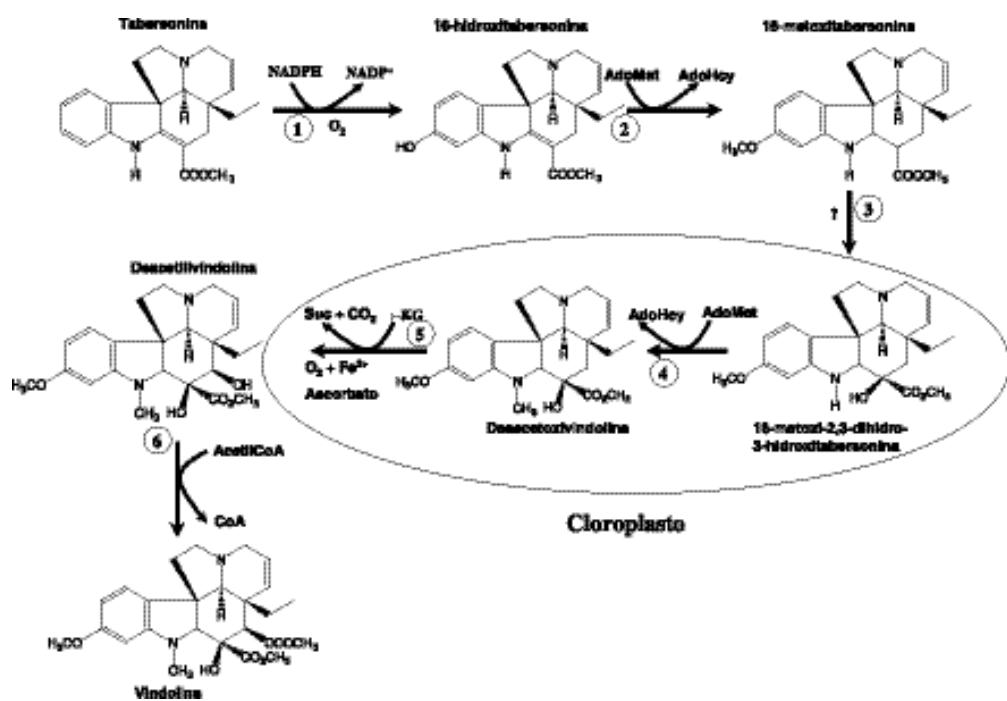


Fig. 10. Biosíntesis de la vindolina. Los números encerrados en un círculo corresponden a las enzimas: tabersonina 16-hidroxilasa (1), 11-O-dimetil-17-O-deacetilvindolina O-metiltransferasa (2), hidroxilasa no caracterizada (3), 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxi-tabersonina N-metiltransferasa (4), deacetoxivindolina 4-hidroxilasa (5), 17-O-deacetilvindolina O-acetyltransferasa (6). [5,18,118,135,164,168,169,174,175,177,178,180-182].

metiltransferasa es la única enzima de esta vía cuya actividad no es afectada por la luz [126].

De todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de la vindolina, la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa es la más interesante. En plántulas de *C. roseus* los transcritos del gen *D4h* y la proteína misma ya se encuentran presentes en la oscuridad. Al exponer las plántulas a la luz, la actividad enzimática de la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y los niveles de los transcritos del gen *D4h* se elevan significativamente. Los resultados reportados sugieren que este aumento en la actividad se debe a una isoenzima de *pI* 4.7, inactiva en la oscuridad, y la cual, en presencia de la luz, sufre una modificación post-traduccional que la torna más ácida y activa [165; 184]. De manera coordinada la luz también induce la transcripción del gen *Dat* y su producto, la 17-*O*-desacetilvindolina-17-*O*-acetiltransferasa, eleva su actividad enzimática [185].

La TDC y la SS en estas plántulas exhiben un pico de actividad a los 5 días después de imbibición en todos los tejidos y ninguna de las dos es estimulada por luz [126,135]. Mientras el MeJa induce la acumulación de vindolina y eleva las actividades enzimáticas de la TDC, la SS, la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y la 17-*O*-desacetoxivindolina-17-*O*-acetiltransferasa [144].

Tabersonina NADPH:oxígeno oxidoreductasa (16-hidroxilante) (EC 1.14.13.73). Esta enzima es una monoxigenasa P450 localizada en el retículo endoplasmático que requiere NADPH, O₂ y tabersonina para llevar a cabo su función (Reacción 1, figura 10). Esta enzima es inhibida por CO, clotrimazol, miconazol y por citocromo C [174].

S-adenosil-L-metionina:11-*O*-dimetil-17-*O*-deacetilvindolina 11-*O*-metiltransferasa (EC 2.1.1.94). Esta metiltransferasa ha sido determinada tanto en cultivos celulares de *C. roseus* [169], como en plantas de la misma especie [135]. La enzima requiere (S)-adenosil-L-metionina como donador de grupos metilos y es altamente específica para la 16-hidroxitabersonina (Reacción 2, figura 10).

S-adenosil-L-metionina:16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina N-metiltransferasa (EC 2.1.1.99). Esta enzima se encuentra localizada en los tilacoides de los cloroplastos [118], requiere (S)-adenosil-L-metionina como donador de grupos metilo (Reacción 4, figura 10) y es altamente específica para su sustrato, la 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina [186]. La enzima ha sido parcialmente purificada tiene una masa molecular aparente de 60 kDa y es absolutamente dependiente de la presencia de un doble enlace en la posición 2 [187].

Desacetoxivindolina,2-oxoglutarato:oxígeno oxidoreductasa (4β-hidroxilante (EC 1.14.11.20). Esta enzima es una dioxigenasa α-cetoglutarato dependiente y cataliza, en el citoplasma, la adición de O₂ a la desacetoxivindolina y al α-cetoglutarato produciendo deacetilvindolina, succinato y CO₂; esta es la penúltima reacción de biosíntesis de la vindolina (Reacción 5, figura 10) [164,175,178]. Esta enzima es alta-

mente específica, únicamente hidroliza el C-4 de la *N*(1)-metil-desacetoxivindolina para formar la *N*(1)-metil desacetilvindolina; la adición de ácido ascórbico y iones ferrosos aumentan su actividad. La enzima, purificada a homogeneidad aparente a partir de hojas jóvenes de *C. roseus*, es un monómero con una masa molecular de aproximadamente 45 kDa y posee tres isoformas con *pI* de 4.6, 4.7 y 4.8.

La cinética de interacción del sustrato con la enzima y los estudios de inhibición del producto, sugieren que la reacción se lleva a cabo mediante un mecanismo Ter-Ter ordenado. En este mecanismo el primer sustrato es el α-cetoglutarato, seguido por el O₂ y al final la desacetoxivindolina; los valores de *K_m* para el α-cetoglutarato, el O₂ y la desacetoxivindolina son de 45, 45 y 0.03 μM, respectivamente [175,178,188,189].

Si bien esta enzima se encuentra en el nivel de trazas en plántulas etioladas de *C. roseus*, su actividad aumenta sustancialmente con la presencia de la luz y con ella, la biosíntesis de vindolina [164,182]. Las plántulas etioladas comienzan a acumular cantidades importantes de transcritos de la hidroxilasa y de la proteína, pero prácticamente no hay actividad durante los diferentes estadios del desarrollo. Por el contrario, el tratamiento con luz produce un aumento importante en la actividad de la enzima, pero el aumento en los niveles del transcripto y de la proteína es muy pequeño. Estos datos sugieren que el punto de regulación por luz en la hidroxilasa se encuentra en el nivel post-traduccional [164,182].

Usando oligonucléótidos degenerados para el escrutinio de una biblioteca de ADNc de plántulas de *C. roseus* se obtuvieron 3 clones, de las cuales dos representan alelos dimórficos cuyas secuencias difieren únicamente en el extremo 3' no traducido [165].

AcetylCoA:17-*O*-deacetilvindolina 17-*O*-acetiltransferasa (EC 2.3.1.107). El último paso en la biosíntesis de la vindolina es catalizado por la 17-deacetilvindolina-*O*-acetiltransferasa dependiente de acetil-CoA (Reacción 6, figura 10) [168; 179]. La aparición de la enzima se encuentra regulada por desarrollo en plántulas de *C. roseus* y la actividad enzimática aparece sólo después de un tratamiento con luz de las plántulas etioladas [179].

Esta acetiltransferasa es una enzima dimérica que ha sido purificada a homogeneidad y tiene una masa molecular de 32/21 kDa [190] o 26/20 kDa [191]. La enzima pura está formada por cinco isoformas con *pI* en el rango de 4.3 y 5.4 [190, 191]. Los valores de *K_m* para la acetil-CoA y para la deacetilvindolina son de 5.4 y 6.5 μM y de 0.7 y 1.3 μM, para las enzimas parcialmente purificadas [179] y purificadas a homogeneidad, respectivamente [190,191]. Los estudios de inhibición muestran que la CoA es un poderoso inhibidor competitivo de la deacetilvindolina (*K_i* = 8 μM) [179] similar a la tabersonina (50% de inhibición a 45 μM) [191]; mientras que la enzima no es inhibida significativamente por la vindolina hasta concentraciones de 2 mM [179,191].

El uso de oligonucléótidos degenerados para los extremos amino y carboxilo terminales y la amplificación posterior de su producto por PCR permitió obtener una sonda con la cual

se llevó a cabo el escrutinio de una biblioteca de ADN genómico de *C. roseus*. Con lo anterior se obtuvo una clona que codifica para una proteína de 439 aminoácidos con la masa molecular predicha de 49,890 Da. La clona, conteniendo una extensión de seis histidinas en el amino terminal, se expresó en *E. coli* mostrando niveles elevados de actividad. La actividad de la enzima recombinante es completamente dependiente de la presencia de deacetilvindolina o de acetil-CoA. El análisis por Western blot de la proteína recombinante de la de hojas de *C. roseus*, rinde una sola banda de 50 kDa de masa molecular, lo que sugiere que el heterodímero aislado durante la purificación es probablemente un artefacto de la técnica empleada [18].

Si bien aún no se ha llevado a cabo la determinación cinética de las enzimas de la biosíntesis de la vindolina, existe suficiente evidencia para decir que los pasos limitantes de esta ruta son las dos reacciones de hidroxilación (Reacciones 1 y 5, figura 10) [18].

Biosíntesis de los alcaloides diméricos

La biosíntesis de los alcaloides bisindólicos se inicia con la condensación de la catarantina y la vindolina, para formar la 3',4'-anhidrovinblastina, el precursor de la vinblastina, la vincristina, la leurosina y la catarina (Figura 11). Esta reacción, al igual que la oxidación posterior, parece ser llevada a cabo por peroxidásas inespecíficas, lo que parece indicar que la limitan-

te de la biosíntesis de este tipo de alcaloides resulta ser la disponibilidad de los precursores monoméricos [192-196]. Sin embargo, recientemente se ha purificado una enzima que cataliza específicamente dicho paso y ha sido denominada α -3',4'-anhidrovinblastina sintasa (AVLBS) (Reacción 1, figura 11). Esta enzima, dependiente de H₂O₂, que ha sido purificada a homogeneidad aparente (192 veces) a partir de hojas de *C. roseus*, tiene una masa molecular de 45.4 kDa y un pH óptimo de 6.5, si bien también presenta una actividad sustancial en el rango de pH de 4 – 5, el cual es el rango de pH comúnmente determinado en las vacuolas. Además de su actividad de AVLBS la enzima pura tiene actividad de peroxidasa. Su espectro visible de absorbancia muestra máximos de absorción a 404, 501 y 633 nm sugiriendo que se trata de una proteína con hierro en un grupo hemo y que pertenece a la familia de las peroxidásas [197].

Compartimentalización

La biosíntesis de los AMIs es un proceso altamente compartimentalizado. La compartimentalización, y la localización en diferentes células de las distintas enzimas involucradas en esta vía metabólica, se pueden considerar como otro mecanismo de regulación, ya que esta ubicación requiere del transporte de los diferentes metabolitos de un punto a otro para su conversión. Prácticamente todos los compartimentos de la célula y

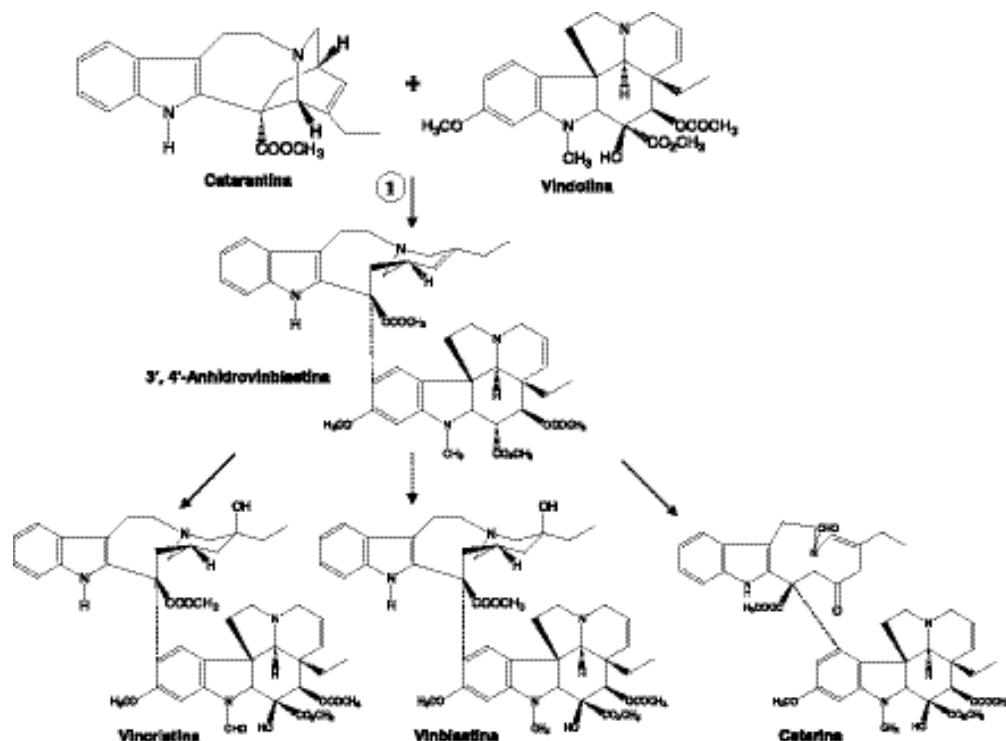


Fig. 11. Biosíntesis de los alcaloides bisindólicos vincristina y vinblastina. Los números encerrados en un círculo corresponden a las enzimas: a-3',4'-anhidrovinblastina sintasa (1). [117,192-197]. Las flechas punteadas indican que las enzimas correspondientes no han sido caracterizadas y/o se desconocen los pasos metabólicos.

diferentes tipos celulares intervienen en el proceso, e. g. el mensajero para la SS presenta una región que codifica para un péptido señal de 31 aminoácidos que lo dirige a la vacuola [122,148]; lo anterior apoya diversos ensayos que sugieren que se trata de una enzima vacuolar [119,148]. Por otra parte las enzimas estrictosidina glucosidasa y tabersonina 16-hidroxilasa se localizan en el retículo endoplásmico [7,174].

Las reacciones catalizadas por las enzimas TDC, 11-*O*-dimetil-17-*O*-deacetilvindolina *O*-metiltransferasa, desacetoxyvindolina-4-hidroxilasa y 17-*O*-desacetilvindolina *O*-acetiltransferasa se llevan a cabo en el citoplasma [118,165,174]; la reacción mediada por la enzima AVLBS se realiza en la vacuola [199]. La 11-*O*-dimetil-17-*O*-deacetilvindolina *O*-metiltransferasa se encuentra en los tilacoides de los cloroplastos (Figura 13) [118].

Los ARNm para la TDC y la SS se localizan en las células de la epidermis de los tallos, hojas y yemas florales, así como en las células corticales y del protoderma alrededor del meristemo apical de la raíz [200]. En las raíces, la actividad enzimática de la TDC se encuentra localizada en el citoplasma y en la región apoplástica de las células meristemáticas, así como en las células de la epidermis de la cápside de la raíz [201].

Los ARNm de la desacetoxyvindolina-4-hidroxilasa y la 17-*O*-desacetilvindolina *O*-acetiltransferasa se localizan sólo en los idioblastos y en las células laticíferas de las hojas, tallos

y yemas florales [200]. Lo anterior sugiere mecanismos de translocación de los intermediarios de una célula a otra, para la biosíntesis de estos metabolitos [200]. Más importante aún es el hecho de que los primeros pasos en la biosíntesis de la vindolina se llevan a cabo en diferentes compartimientos celulares a los de los últimos pasos [182].

La tabersonina da origen a productos finales que se encuentran en tejidos diferentes en la planta (Figura 12) [180]. En este caso el ARNm para la minovincinina 19-*O*-acetiltransferasa (Reacción 8, figura 12) sólo se expresa en las células corticales de los meristemos radiculares; puesto que la TDC y la SS también se expresan en los mismos tipos de célula, se puede inferir que en ellas se llevan a cabo la biosíntesis de la tabersonina y de sus derivados.

Regulación

Investigaciones realizadas con la fracción indólica, empleando células en suspensión de *C. roseus*, sugieren que no existe relación directa entre los valores de máxima actividad de la enzima TDC y la producción de alcaloides [131,202,203]; los datos de Eilert *et al.* [204], empleando inductores de origen fúngico, también apoyan esta última conclusión. Sin embargo, también se ha reportado que variando la concentración de

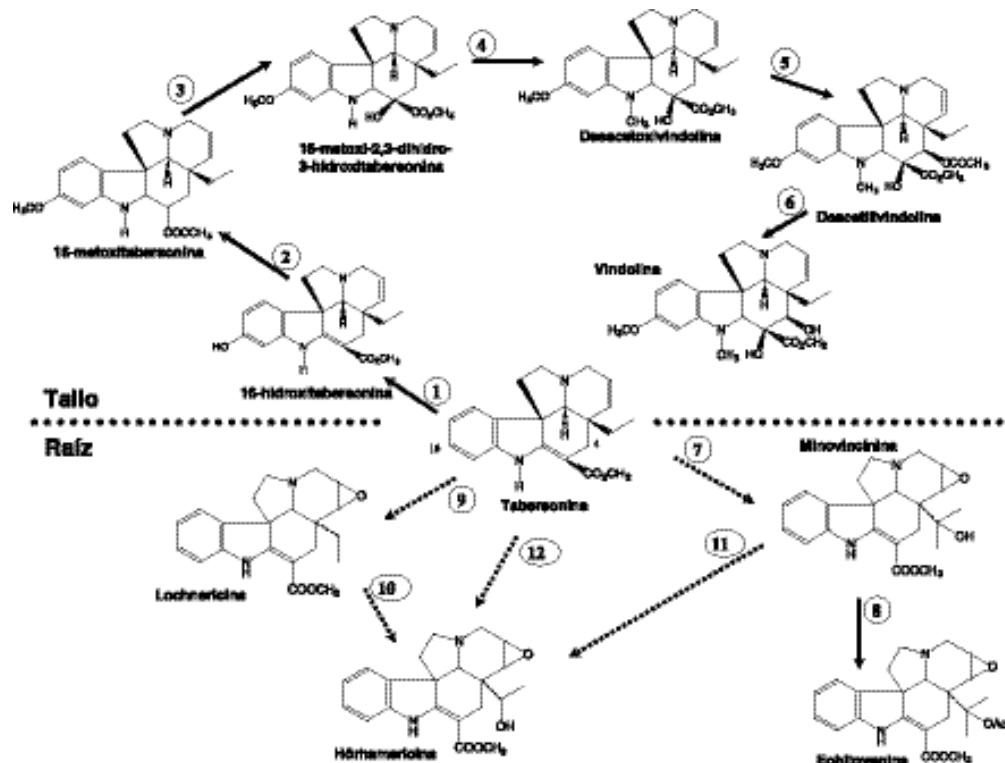


Fig. 12. Compartimentalización de la biosíntesis de la vindolina y otros AMIs. Los números encerrados en un círculo corresponden a las enzimas: tabersonina 16-hidroxilasa (1), (S)-adenosil-L-metionina-16-hidroxitabersonina-*O*-metiltransferasa (2), hidroxilasa no caracterizada (3), S-adenosil-L-metionina: 2, 3-dihidro-3-hidroxitabersonina-*N*-metiltransferasa (4), deacetoxivindolina 4-hidroxilasa (5), acetil CoA: desacetilvindolina 4-*O*-acetiltransferasa (6), Tabersonina 19-hidroxilasa (7) y (10), minovincinina 19-*O*-acetiltransferasa (8), hidroxilasas (9) y (11) [13,18, 180,180-182,198].

nutrimentos se observa una correlación positiva entre la actividad de la enzima TDC y la acumulación de alcaloides [205]. Es posible que la discrepancia entre resultados se deba a la clona en estudio [206].

La adición de geraniol, 10-hidroxigeraniol y secologanina, precursores de la parte terpélica de la vía, aumenta los niveles de alcaloides, particularmente de tabersonina, en cultivos de células en suspensión, lo que parece indicar que la producción de alcaloides puede resultar limitada por una o más etapas de la ruta terpélica [13,63,149,202,207,208]. Aunque esta conclusión no puede ser generalizada ya que existen evidencias contradictorias como el aumento en la producción de alcaloides mediante la adición de triptamina al medio de cultivo [209]. Por otra parte, la adición de mevalonato no tiene efecto en la biosíntesis de los AMIs [13]; sin embargo, es importante tomar en cuenta que recientemente se ha demostrado que los resultados dependen fundamentalmente de dos factores: la concentración de los productos adicionados y la etapa en la que se encuentra el cultivo receptor. Mientras que bajas concentraciones de triptofano en la etapa temprana de la fase

estacionaria produce un aumento en la biosíntesis de alcaloides la adición de diversos precursores en la etapa tardía del ciclo de cultivo no produce ningún efecto [208].

Se ha utilizado líneas de *C. roseus* en suspensión celular que sobreexpresan a la TDC y a la SS para realizar experimentos de adición de precursores [132,203,210]. En general, la adición de secologanina al momento de la inoculación produce un aumento importante en la cantidad de los AMIs; en tanto que la adición, junto con la loganina, de triptófano o triptamina, produce un aumento aún mayor en la biosíntesis de los AMIs en ambas líneas transgénicas.

La adición de efectores externos como homogenados fúngicos, cambio del pH del medio de cultivo, etc., también modifican, en algunos casos sustancialmente, la biosíntesis de AMIs [176,211-218].

Mientras que la adición de pectinasa aumenta los niveles de tabersonina 2.5 veces, la adición de quitina eleva los niveles de ajmalicina en 50% y la adición de ácido jasmónico aumenta los niveles de lochnericina y horthammericina, pero no los de tabersonina [13]. La adición tanto de homogenizados

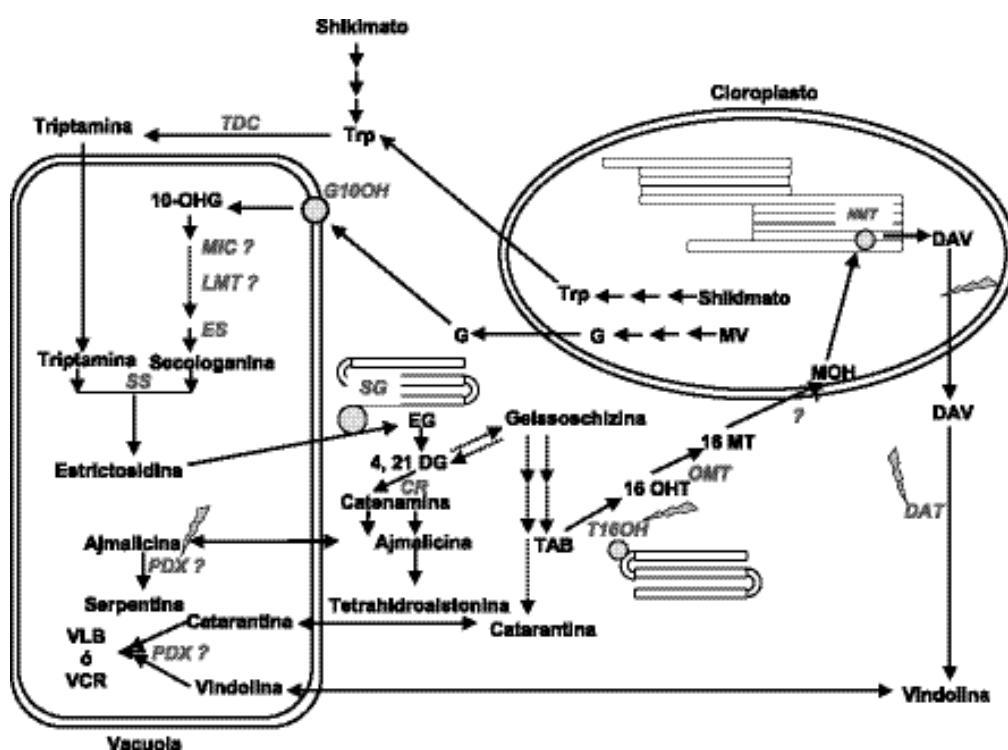


Fig. 13. Compartimentalización de la biosíntesis de los alcaloides indólicos en *C. roseus*. Redibujado de Meijer *et al.* [19] y Verpoorte *et al.* [221]. En la figura se muestra que todos los pasos se llevan a cabo en una sola célula, lo cual no es el caso. Los rayos indican enzimas que se sabe son reguladas por luz. Las flechas punteadas se refieren a reacciones que no están del todo caracterizadas. Trp = triptófano; G = geraniol; MV = mevalonato; DAV = dacetylvinodolina; MOH = 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina; 16 MT = 16-metoxitabersonina; 16-OHT = 16-hidroxitabersonina; TAB = tabersonina; EG = Estrictosidina glicona; DG = Estrictosidina aglicona; 10-OHG = 10-hidroxigeraniol; VLB = vinblastina; VCR = vincristina; G10OH = geraniol 10-hidroxilasa; MIC = monoterpénilo (iridodial) ciclasa; LMT = (S)-adenosil-L-metionina:ácido logánico metil transferasa; ES = estrictosidina sintasa; PDX = peroxidasa básica; SG = estrictosidina glucosidasa; CR = catenamina reducasa; TGA = tetrahidroalstonina sintasa; GDH = geizzoschizina deshidrogenasa; T16OH = tabersonina 16-hidroxilasa; OMT = 11-O-dimetil-17-O-deacetilvinodolina O-metiltransferasa; NMT = 16-metoxi-2,3-dihidro-3-hidroxitabersonina N-metiltransferasa; D4H = deacetoxilvinodolina-4-hidroxilasa; DAT = 17-O-deacetilvinodolina O-acetiltransferasa. Los signos de interrogación denotan enzimas que aún se desconocen o que existen reportes contradictorios por el momento. Para una visión global de las diferentes células que intervienen en la biosíntesis de los alcaloides indólicos en *C. roseus* ver la figura 14.

de micelios fúngicos, como de filtrados provenientes de cultivos de hongos aumentan de forma importante la acumulación de diferentes AMIs [176,211,218].

Existen otros factores medioambientales que también modifican de manera importante la biosíntesis de los AMIs; entre éstos los extremos osmótico y salino se encuentran entre los más importantes [211,213,219]. La adición de KCl, NaCl, manitol y sorbitol incrementan la acumulación de AMIs. Cuando conjuntamente se utiliza alguno de estos efectores y se adicionan precursores de la biosíntesis de AMIs como triptamina y triptófano, la producción de los AMIs mejora sustancialmente [219].

La biosíntesis de la catarantina y de la vindolina se encuentra diferencialmente regulada. La biosíntesis de la vindolina es regulada en cuatro diferentes niveles: tisular, celular, por desarrollo y el medio ambiente, en tanto que la de la catarantina no lo es.

La localización tejido-específica de las enzimas para la biosíntesis de los AMIs, la regulación ontogénica de la biosíntesis de vindolina como resultado de la expresión coordinada de las enzimas involucradas en el proceso, así como la presencia de alcaloides específicos en los tejidos de la raíz y en la parte aérea de las plantas confirman que las rutas de biosíntesis son expresadas de una forma tejido-específica. Durante el desarrollo de la plántula, las actividades de la TDC y la SS son expresadas 36 – 48 horas antes que las de la desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa [126]. La activación de estas dos últimas enzimas coincide con la transformación cuantitativa de la tabersonina en vindolina y requiere de la participación de la luz [126,164,182,183, 220]. También se ha determinado que existe un gradiente basipetal de expresión de las enzimas TDC, SS, desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa, lo que sugiere que la expresión de biosíntesis de la vindolina ocurre暂zeitigamente durante el desarrollo temprano de la hoja, el tallo y la raíz [1, 200].

La luz juega un papel central en la regulación de la biosíntesis de algunos alcaloides. En particular la luz activa algunos de los últimos pasos de la ruta de biosíntesis de la vindolina. La luz no participa en la formación de los idioblastos ni de las células laticíferas, por lo que aún está por determinarse como ocurre la activación por la luz de las enzimas que llevan a cabo la inducción de la biosíntesis de los AMIs [182].

En suma, la catarantina es biosintetizada a lo largo de todos los tejidos de la planta, en tanto que la vindolina es biosintetizada sólo en las partes aéreas. Las reacciones catalizadas por la TDC y la SS se encuentran localizadas en la epidermis superior e inferior de las hojas y en el protoderma de la raíz y en las células corticales alrededor del meristemo apical. La desacetoxivindolina-4-hidroxilasa y la 17-O-desacetilvindolina O-acetiltransferasa se encuentran en los idioblastos y en las células laticíferas (Figura 14). Es posible que la raíz biosintetice catarantina y tabersonina y que éstas sean transportadas vía xilema a las células laticíferas asociadas a las traqueidas. Estas últimas células pueden convertir tabersonina en

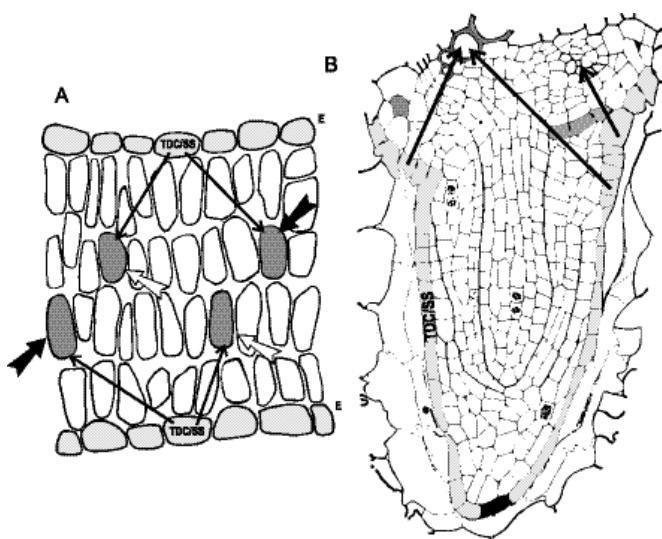


Fig. 14. Compartimentalización de la biosíntesis de alcaloides en *C. roseus*. (A) Corte transversal de una hoja de *C. roseus* y (B) corte longitudinal de una raíz. E = epidermis. Las flechas llenas señalan idioblastos y las flechas vacías señalan células laticíferas.

vindolina y ésta acoplarse con catarantina para formar los alcaloides bisindólicos.

Diferenciación celular

El proceso de desarrollo produce, además de la morfogénesis, la especialización bioquímica de la células dando como resultado la biosíntesis y/o acumulación de metabolitos secundarios tales como alcaloides de diferente origen biosintético [131, 222-227]. Se ha determinado que el contenido de hiosciamina, alcaloide derivado del tropano, en raíces transformadas de *Hyoscyamus muticus* es similar al determinado en las raíces de plantas completas. Sin embargo, cuando las raíces son desdiferenciadas a callo, el contenido del alcaloide disminuye al nivel de trazas; cuando los callos son rediferenciados a raíces, el contenido de alcaloides vuelve a los niveles originales; este protocolo se puede repetir infinitud de veces con el mismo resultado [222].

En otros procesos también se ha determinado que existe una correlación directa entre la diferenciación celular y la biosíntesis de metabolitos secundarios, *e. g.* la de monoterpenos en las glándulas epidérmicas de *Mentha piperita* [228]. En *C. roseus* se ha propuesto que la presencia de células laticíferas son esenciales para la producción de alcaloides monoterpenoindólicos [135]; así, la vindolina, una de las dos unidades monoméricas de los alcaloides bisindólicos, se biosintetiza en brotes pero no en los callos [229]. Se han obtenido resultados similares para el caso de la vinblastina, ya que este producto se acumula en brotes regenerados a partir de callos de *C. roseus* pero no en callos o en suspensiones celulares [230, 231]. La catarantina, por otra parte, se produce prácticamente en toda la planta [232-234].

Conclusiones

Un problema importante a considerar en el estudio del metabolismo secundario en general, y en particular en el de *C. roseus*, es el hecho de que no se ha utilizado un solo modelo. En el caso de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los alcaloides monoterpeno-indólicos, las enzimas estudiadas han sido aisladas de diferentes fuentes, y si bien es importante analizar la diversidad existente para estructurar un modelo para confrontarlo con la realidad, también lo es el poder tener una ruta biosintética completa en un solo modelo.

Se ha determinado que los niveles de alcaloides totales en las raíces en cultivo son de aproximadamente un orden de magnitud mayor que en las células en suspensión, confirmándose con esto que la diferenciación celular juega un papel importante en la biosíntesis de los alcaloides [235]. Las raíces transformadas de *C. roseus* poseen la capacidad de biosintetizar y acumular alcaloides indólicos en cantidades similares a los de las raíces de las plantas [235-239], además de biosintetizar alcaloides que no habían sido reportados con anterioridad como la *O*-acetilvalesamina [239] y la 19(S)-epimisilina [240].

La elucidación de la ruta de biosíntesis que lleva a los productos naturales, sólo puede alcanzarse mediante la purificación de cada una de las enzimas. El conocimiento que se tiene hoy en día de la biosíntesis de los AMIs es aún fragmentado; mientras que ya se conoce con bastante profundidad la ruta de biosíntesis de vindolina a partir de tabersonina, incluyendo la clonación de algunos de los genes que codifican para las enzimas requeridas [18], aún se está lejos de entender la biosíntesis de la secologanina, la ajmalicina, la tabersonina, la catarantina y de varios de los intermediarios de la ruta de los AMIs, aunque sabemos que la luz y el estadio de desarrollo regulan la actividad y expresión de algunas de las enzimas.

Se sabe que la biosíntesis de la vindolina y de la catarantina son reguladas diferencialmente; la biosíntesis de la primera se encuentra bajo un control celular (participan el cloroplasto, el citoplasma, el retículo endoplásmico y la vacuola), de desarrollo (los alcaloides se biosintetizan preferentemente en los tejidos jóvenes), de tejido (participan por lo menos tres tipos de células) y medio ambiental (luz) más estricto que la de la catarantina. También sabemos que el uso de efectores que producen un aumento en el contenido de alcaloides en las células, provoca un incremento en la actividad de algunas de las enzimas o en los niveles de expresión de algunos de los genes que las codifican.

Sin embargo, lo más importante es el hecho de que se cuenta hoy en día con modelos experimentales tales como plántulas, cultivos celulares y raíces transformadas de *C. roseus*, así como con herramientas tales como anticuerpos, sondas moleculares y particularmente con las nuevas metodologías provenientes de la proteómica.

Recientemente se han planteado algunas de las preguntas que faltan por resolver: cual es el número de pasos de la vía que se llevan a cabo en la epidermis o en los ápices radicales; si la biosíntesis de los alcaloides en las raíces y en la epider-

mis obedece a diferentes papeles biológicos y funciones ecológicas de los productos finales; que clase de tejidos produce intermediarios específicos para la biosíntesis de la vindolina; como son movilizados los intermediarios en las células laticíferas y en los idioblastos; para que se requiere un sistema tan sofisticado de biosíntesis; que alcaloides se acumulan en las células laticíferas, los idioblastos, la epidermis y las raíces [1].

Otra pregunta central para entender la biosíntesis de los AMIs es porqué los efectores externos aumentan selectivamente la biosíntesis de sólo uno de los alcaloides y no la de todos, aunque ya se ha propuesto la existencia de canales metabólicos para explicar estos resultados, y los de diferenciación celular [131]. También es importante determinar si existen transportadores específicos para el movimiento de los diferentes alcaloides entre los diferentes compartimientos celulares y los diferentes tejidos. Por otra parte, se debe evaluar el hecho de que varias de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los productos naturales tienen homología con proteínas relacionadas con patogenicidad.

La complejidad de los procesos genéticos, catalíticos y de transporte de la biosíntesis de los AMIs es uno de los retos intelectuales más estimulantes en el área de los metabolitos secundarios actualmente. Si bien se requieren más de 50 pasos metabólicos para sintetizar los alcaloides más importantes de *C. roseus*, solamente se han determinado y caracterizada en algún grado alrededor de 20 de las enzimas requeridas (Tabla 1). Por lo que aún faltan por elucidar un número importante de pasos metabólicos, purificar las enzimas correspondientes y clonar sus genes. También es necesario elucidar los diversos aspectos de su regulación, tanto en el nivel celular como en el molecular, pero sobre todo determinar cual es la función de los AMIs en las plantas que los producen.

Agradecimientos

Los autores agradecen la revisión realizada por dos anónimos evaluadores, y cuyos comentarios y observaciones mejoraron sustancialmente el presente trabajo. Para la nomenclatura de las enzimas se utilizaron las reglas de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>).

Bibliografía

1. De Luca, V.; St Pierre, B. *Trends Plant Sci.* **2000**, 5, 168-173.
2. Roberts, M. F.; Wink, M. En: *Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications*; Roberts, M. F., Wink, M., Eds.; Plenum Press: New York and London, **1998**; pp 1-7.
3. Schmeller, T.; Wink, M. En: *Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications*; Roberts, M. F., Wink, M., Eds.; Plenum Press: New York, **1998**; pp 435-459.
4. Kutchan, T. M.; Dittrich, H.; Bracher, D.; Zenk, M. H. *Tetrahedron* **1991**, 47, 5945-5954.
5. Roberts, M. F. En: *Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications*; Roberts, M. F., Wink, M., Eds.; Plenum Press: New York, **1998**; pp 109-146.

6. Kutchan, T. M. *The Plant Cell* **1995**, 7, 1059-1070.
7. Geerlings, A.; Ibañez, M. M. L.; Memelink, J.; Van der Heijden, R.; Verpoorte, R. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 3051-3056.
8. Waterman, P. G. En: *Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications*; Roberts, M. F., Wink, M., Eds.; Plenum Press: New York, **1998**; pp 87-107.
9. Cordell, G. A. En: *The Alkaloids*; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press: San Diego, **1999**; pp 261-376.
10. Svoboda, G. H.; Blake, D. A. En: *The Catharanthus Alkaloids*; Taylor, W. I., Farnsworth, N. R., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, **1975**; pp 45-83.
11. Singh, S. N.; Vats, P.; Suri, S.; Shyam, R.; Kumria, M. M. L.; Ranganathan, S.; Sridharan, K. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, 76, 269-277.
12. Van der Heijden, R.; Verpoorte, R.; Ten Hoopen, H. J. G. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1989**, 18, 231-280.
13. Shanks, J. V.; Bhadra, R.; Morgan, J.; Rijhwani, S.; Vani, S. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 58, 333-338.
14. Moreno, P. R. H.; Van der Heijden, R.; Verpoorte, R. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1995**, 42, 1-25.
15. Scott, I. A. *Acc. Chem. Res.* **1979**, 3, 151.
16. De Luca, V.; Laflamme, P. *Curr. Op. Plant Biol.* **2001**, 4, 225-233.
17. Verpoorte, R.; Van der Heijden, R.; Schripsema, J.; Hoge, J. H. C.; Ten Hoopen, H. J. G. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 186-207.
18. De Luca, V.; St-Pierre, B.; Vázquez-Flota, F.; Laflamme, D. En: *Cellular Integration of Signalling Pathways in Plant Development*; Lo Chiavo, F., Last, R. L., Morelli, G., Raikhel, N. V., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, **1998**; pp 171-187.
19. Meijer, A. H.; Verpoorte, R.; Hoge, J. H. C. *J. Plant Res.* **1993**, 3, 145-164.
20. De Luca, V. En: *Methods in Plant Biochemistry Vol. 9*; Lea, P. J., Ed.; Academic Press Limited: London, **1993**; pp 345-368.
21. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*; W.H. Freeman and Company: New York, **1995**; pp 1-974.
22. Mathews, C. K.; Van Holde, K. E.; Ahern, K. G. *Biochemistry*; Addison Wesley Longman: San Francisco, **2000**; pp 1-1186.
23. Lichtenthaler, H. K. En: *Discoveries in Plant Biology*; Kung, S.-D., Yang, S.-F., Eds.; London, **2001**; pp 141-161.
24. Lange, B. M.; Rujan, T.; Martin, W.; Croteau, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **2000**, 97, 13172-13177.
25. Adam, K. P.; Zapp, J. *Phytochemistry* **1998**, 48, 953-959.
26. Arigoni, D.; Sagner, S.; Latzel, C.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1997**, 94, 10600-10605.
27. McCaskill, D.; Croteau, R. *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 349-355.
28. Bloch, K.; Chaykin, S.; Phillips, A. H.; de Waard, A. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 2595-2604.
29. Tchen, T. T. *J. Biol. Chem.* **1958**, 233, 1100-1103.
30. Agranoff, B. W.; Eggerer, H.; Henning, U.; Lynen, F. *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 326-332.
31. Stern, J. R.; Drummond, G. I.; Coon, M. J.; del Campillo, A. J. *Biol. Chem.* **1960**, 235, 313-317.
32. Rudney, H. J. *Biol. Chem.* **1957**, 227, 363-377.
33. Durr, I. F.; Rudney, H. J. *Biol. Chem.* **1960**, 235, 2572-2578.
34. Gray, J. C. En: *Advances in Botanical Research Vol. 14*; Callow, J. A., Ed.; Academic Press: New York, **1987**; pp 25-91.
35. Gershenzon, J.; Croteau, R. *Rec. Advan. Phytochem.* **1990**, 24, 99-160.
36. Bach, T. J.; Raudot, V.; Vollack, K.-U.; Weber, T.; Zeiler, S. *Plant Physiol. Biochem.* **1994**, 32, 775-783.
37. Van der Heijden, R.; De Boer-Hlupá, V.; Verpoorte, R.; Duine, J. A. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1994**, 38, 345-349.
38. Bach, T. J. *Lipids* **1995**, 30, 191-202.
39. Chappell, J. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1995**, 46, 521-547.
40. Chappell, J.; Wolf, F.; Proulx, J.; Cuellar, R.; Saunders, C. *Plant Physiol.* **1995**, 109, 1337-1343.
41. Chappell, J. *Plant Physiol.* **1995**, 107, 1-6.
42. Goldstein, J. L.; Brown, M. S. *Nature* **1990**, 343, 425-430.
43. Heintze, A.; Riedel, A.; Aydogdu, S.; Schultz, G. *Plant Physiol. Biochem.* **1994**, 32, 791-797.
44. Lichtenthaler, H. K.; Rohmer, M.; Schwender, J.; Disch, A.; Seemann, M. En: *Physiology, biochemistry and molecular biology of plant lipids*; Williams, J. P., Khan, M. U., Lem, N. W., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **1997**; pp 177-179.
45. Schwender, J.; Seemann, M.; Lichtenthaler, H. K.; Rohmer, M. *Biochem. J.* **1996**, 316, 73-80.
46. Banthorpe, D. V.; Bucknall, G. A.; Doonan, H. J.; Doonan, S.; Rowan, M. G. *Phytochemistry* **1976**, 15, 91-100.
47. Reed, B. C.; Rilling, H. C. *Biochemistry* **1975**, 14, 50-54.
48. Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. *Biochem. J.* **1993**, 295, 517-524.
49. Lichtenthaler, H. K. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, 50, 47-65.
50. Lange, B. M.; Wildung, M. R.; McCaskill, D.; Croteau, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1998**, 95, 2100-2104.
51. Contin, A.; Van der Heijden, R.; Lefeber, A. W.; Verpoorte, R. *FEBS Lett.* **1998**, 434, 413-416.
52. Ayora-Talavera, T.; Chappell, J.; Lozoya-Gloria, E.; Loyola-Vargas, V. M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, 97, 135-145.
53. Meijer, A. H.; De Waal, A.; Verpoorte, R. *J. Chromatogr.* **1993**, 635, 237-249.
54. Canto-Cánchez, B.; Loyola-Vargas, V. M. *Phyton* **2000**, 66, 183-190.
55. Canto-Cánchez, B.; Loyola-Vargas, V. M. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* **2001**, 37, 622-628.
56. Madayastha, K. M.; Coscia, C. J. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 2419-2427.
57. Madayastha, K. M.; Coscia, C. J. *Rec. Advan. Phytochem.* **1979**, 13, 85-129.
58. Sánchez-Iturbe, P.; Galaz-Avalos, R. M.; Loyola-Vargas, V. M. Semipurification of a monoterpen cyclase from hairy roots of *Catharanthus roseus*. *Journal of Plant Physiology* **2003**. (GENERIC)
59. Madayastha, K. M.; Guarnaccia, R.; Baxter, C.; Coscia, C. J. *Biol. Chem.* **1973**, 248, 2497-2501.
60. Irmller, S.; Schröder, G.; St-Pierre, B.; Crouch, N. P.; Hotze, M.; Schmidt, J.; Strack, D.; Matern, U.; Schröder, J. *Plant J.* **2000**, 24, 797-804.
61. Yamamoto, H.; Katano, N.; Ooi, A.; Inoue, K. *Phytochemistry* **2000**, 53, 7-12.
62. Meijer, A. H. *Cytochrome P-450 and secondary metabolism in Catharanthus roseus*; Faculteit der gedeputeerdeheid: Gravenhage, **1993**; pp 1-151.
63. Schiel, O.; Witte, L.; Berlin, J. Z. *Naturforsch. [C]* **1987**, 42c, 1075-1081.
64. McFarlane, J.; Madayastha, K. M.; Coscia, C. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, 66, 1363-1369.
65. Bach, J.; Weber, T. En: *Biological Role of Plant Lipids*; Biacs, P. A., Orliz, K., Kremmer, T., Eds.; Plenum Pub. Corp.: New York & London, **1989**; pp 279-282.
66. McGarvey, D. J.; Croteau, R. *The Plant Cell* **1995**, 7, 1015-1026.
67. Van der Heijden, R.; Verpoorte, R. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1995**, 43, 85-88.
68. Van der Heijden, R.; Verpoorte, R.; Duine, J. A. *Plant Physiol. Biochem.* **1994**, 32, 807-812.
69. Heintze, A.; Gorlach, J.; Leuchner, C.; Hope, P.; Hagelstein, P.; Schulze-Siebert, D.; Schultz, G. *Plant Physiol.* **2003**, 93, 1121-1127.

70. McCaskill, D.; Croteau, R. *Planta* **1995**, *197*, 49-56.
71. Weissenborn, D. L.; Denbow, C. J.; Laine, M.; Lång, S. S.; Yang, Z.; Yu, X.; Cramer, C. L. *Physiol. Plant.* **1995**, *93*, 393-400.
72. Enjuto, M.; Balcells, L.; Campos, N.; Caelles, C.; Arró, M.; Boronat, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1994**, *91*, 927-931.
73. Budde, R. J. A.; Chollet, R. *Physiol. Plant.* **1988**, *72*, 435-439.
74. Bach, T. J. *Plant Physiol. Biochem.* **1987**, *25*, 163-178.
75. Huber, S. C.; Huber, J. L.; McMichael, R. W., Jr. *Int. Rev. Cytol.* **1994**, *149*, 47-98.
76. Ball, K. L.; Dale, S.; Weekes, J.; Hardie, D. G. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 743-750.
77. Dale, S.; Arró, M.; Becerra, B.; Morrice, N. G.; Boronat, A.; Hardie, D. G.; Ferrer, A. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 506-513.
78. Barker, J. H. A.; Slocombe, S. P.; Ball, K. L.; Hardie, D. G.; Shewry, P. R.; Halford, N. G. *Plant Physiol.* **1996**, *112*, 1141-1149.
79. Douglas, P.; Pigaglio, E.; Ferrer, A.; Halfords, N. G.; MacKintosh, C. *Biochem. J.* **1997**, *325*, 101-109.
80. Daraselia, N. D.; Tarchevskaya, S.; Narita, J. O. *Plant Physiol.* **1996**, *112*, 727-733.
81. Peffley, D. M.; Gayen, A. K. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *337*, 251-260.
82. Lopez, D.; Chambers, C. M.; Ness, G. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *343*, 118-122.
83. Hampton, R.; Dimster-Denk, D.; Rine, J. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 140-145.
84. Choi, D.; Ward, B. L.; Bostock, R. M. *The Plant Cell* **1992**, *4*, 1333-1344.
85. Narita, J. O.; Gruisse, W. *The Plant Cell* **1989**, *1*, 181-190.
86. Korth, K. L.; Jaggard, D. A. W.; Dixon, R. A. *Plant J.* **2000**, *23*, 507-516.
87. Wititsuwannakul, R.; Wititsuwannakul, D.; Suwanmanee, P. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1401-1403.
88. Kondo, K.; Oba, K. *J. Biochem.* **1986**, *100*, 967-974.
89. Bach, T. J.; Rogers, D. H.; Rudney, H. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *154*, 103-111.
90. Bach, T. J.; Weber, T.; Motel, A. *Rec. Advan. Phytochem.* **1990**, *24*, 1-82.
91. Reddy, A. R.; Das, V. S. R. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2471-2474.
92. Arebalo, R. E.; Mitchell, E. D. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 13-18.
93. Galaz-Avalos, R. M. *Estudio sobre la enzima 3-hidroxi-3metil glutaril CoA reductasa en raíces transformadas de Catharanthus roseus*; ITM/CICY: Mérida, **1996**; pp 1-53.
94. Gutiérrez-Pacheco, L. C. *Establecimiento de protocolos de solubilización con detergente y purificación por cromatografía de afinidad de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa de raíces transformadas de Catharanthus roseus (L.) G. Don*; CICY: Mérida, **2000**; pp 1-106.
95. Chin, D. J.; Gil, G.; Russell, D. W.; Liscum, L.; Luskey, K. L.; Basu, S. K.; Okayama, H.; Berg, P.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. *Nature* **1984**, *308*, 613-617.
96. Brown, W. E.; Rodwell, V. W. En: *Dehydrogenases Requiring Nicotinamide Coenzymes*; Jeffery, J., Ed.; Birkhauser Verlag: Basel, **1980**; pp 232-272.
97. Learned, R. M.; Fink, G. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1989**, *86*, 2779-2783.
98. Qureshi, N.; Dugan, R. E.; Cleland, W. W.; Porter, J. W. *Biochemistry* **1976**, *15*, 4191-4197.
99. Wong, R. J.; McCormack, D. K.; Russell, D. W. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *216*, 631-638.
100. Rogers, D. H.; Panini, S. R.; Rudney, H. En: *3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase*; Sabine, J. R., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Fl, **1983**; pp 57-75.
101. Meehan, T. D.; Coscia, C. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *53*, 1043-1048.
102. Madayastha, K. M.; Ridgway, J. E.; Dwyer, J. G.; Coscia, C. J. *J. Cell Biol.* **1977**, *72*, 302-313.
103. Donaldson, R. P.; Luster, D. G. *Plant Physiol.* **1991**, *96*, 669-674.
104. Meijer, A. H.; Lopes-Cardoso, M. I.; Verpoorte, R.; Hoge, J. H. *C. Plant J.* **1993**, *4*, 47-60.
105. Madayastha, K. M.; Meehan, T. D.; Coscia, C. J. *Biochemistry* **1976**, *15*, 1097-1102.
106. Vetter, H.-P.; Mangold, U.; Schröder, G.; Marner, F.-J.; Werck-Reichhart, D.; Schröder, J. *Plant Physiol.* **1992**, *100*, 998-1007.
107. Uesato, S.; Ogawa, Y.; Inouya, H.; Saiki, K.; Zenk, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *13*, 2893-2896.
108. Ikeda, H.; Esaki, N.; Nakai, S.; Hashimoto, K.; Uesato, S.; Soda, K.; Fujita, T. *J. Biochem. (Tokyo)* **1991**, *109*, 341-347.
109. Uesato, S.; Ikeda, H.; Fujita, T.; Inouye, H.; Zenk, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4431-4434.
110. Katano, N.; Yamamoto, H.; Iio, R.; Inoue, K. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 53-58.
111. Yamamoto, H.; Katano, N.; Ooi, Y.; Inoue, K. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 417-422.
112. Stöckigt, J.; Zenk, M. H. *FEBS Lett.* **1977**, *79*, 233-237.
113. Stöckigt, J.; Treimer, J. F.; Zenk, M. H. *FEBS Lett.* **1976**, *70*, 267-270.
114. Stöckigt, J.; Zenk, M. H. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 646-648.
115. Stöckigt, J.; Husson, H.-P.; Kan-fan, Ch.; Zenk, M. H. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1977**, 164-166.
116. Sundberg, R. J.; Smith, S. Q. En: *The Alkaloids*; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press: San Diego, **2002**; pp 281-376.
117. Verpoorte, R.; Van der Heijden, R.; Moreno, P. R. H. En: *The Alkaloids*; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press: San Diego, **1997**; pp 221-299.
118. De Luca, V.; Cutler, A. J. *Plant Physiol.* **1987**, *85*, 1099-1102.
119. Stevens, L. H.; Blom, T. J. M.; Verpoorte, R. *Plant Cell Rep.* **1993**, *12*, 573-576.
120. Fernandez, J. A.; Kurz, W. G. W.; De Luca, V. *Biochem. Cell Biol.* **1989**, *67*, 730-734.
121. Islas-Flores, I. R.; Loyola-Vargas, V. M.; Miranda-Ham, M. L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* **1994**, *30P*, 81-83.
122. Pasquali, G.; Goddijn, O. J. M.; De Waal, A.; Verpoorte, R.; Schilperoort, R. A.; Hoge, J. H. C.; Memelink, J. *Plant Mol. Biol.* **1992**, *18*, 1121-1131.
123. Moreno-Valenzuela, O. A. *Regulación de la vía de síntesis de los alcaloides indólicos en raíces transformadas de Catharanthus roseus*; Centro de Investigación Científica de Yucatán: Mérida, Yucatán, **1999**; pp 1-94.
124. Goddijn, O. J. M.; De Kam, R. J.; Zanetti, A.; Schilperoort, R. A.; Hoge, J. H. C. *Plant Mol. Biol.* **1992**, *18*, 1113-1120.
125. Noé, W.; Mollenschott, C.; Berlin, J. *Plant Mol. Biol.* **1984**, *3*, 281-288.
126. De Luca, V.; Fernández, A. J.; Campbell, D.; Kurz, W. G. W. *Plant Physiol.* **1988**, *86*, 447-450.
127. Morris, P.; Scragg, A. H.; Smart, N. J.; Stafford, A. En: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*; Dixon, R. A., Ed.; IRL Press: Oxford, **1985**; pp 127-167.
128. Knobloch, K.-H.; Berlin, J. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1983**, *2*, 333-340.
129. Mérialon, J. M.; Ouelhazi, L.; Doireau, P.; Chenieux, J. C.; Rideau, M. *J. Plant Physiol.* **1989**, *134*, 54-60.
130. Eilert, U.; De Luca, V.; Constabel, F.; Kurz, W. G. W. *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *254*, 491-497.
131. Moreno-Valenzuela, O. A.; Galaz-Avalos, R. M.; Minero-García, Y.; Loyola-Vargas, V. M. *Plant Cell Rep.* **1998**, *18*, 99-104.
132. Whitmer, S.; Van der Heijden, R.; Verpoorte, R. *J. Biotechnol.* **2002**, *96*, 193-203.
133. Goddijn, O. J. M.; Van der Duyn Schouten, P. M.; Schilperoort, R. A.; Hoge, J. H. C. *Plant Mol. Biol.* **1993**, *22*, 907-912.

134. Knobloch, K.-H.; Hansen, B.; Berlin, J. *Z. Naturforsch. [C]* **1981**, *36c*, 40-43.
135. De Luca, V.; Balsevich, J.; Tyler, R. T.; Eilert, U.; Panchuk, B. D.; Kurz, W. G. W. *J. Plant Physiol.* **1986**, *125*, 147-156.
136. Treimer, J. F.; Zenk, M. H. *FEBS Lett.* **1979**, *97*, 159-162.
137. Treimer, J. F.; Zenk, M. H. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *101*, 225-233.
138. Mizukami, H.; Nordlov, H.; Lee, S.-L.; Scott, A. I. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3760-3763.
139. Pfitzner, U.; Zenk, M. H. *Planta Med.* **1989**, *55*, 525-530.
140. De Waal, A.; Meijer, A. H.; Verpoorte, R. *Biochem. J.* **1995**, *306*, 571-580.
141. Kutchan, T. M. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 493-506.
142. Canel, C.; Lopes-Cardoso, M. I.; Whitmer, S.; Van der Fits, L.; Pasquali, G.; Van der Heijden, R.; Hoge, J. H. C.; Verpoorte, R. *Planta* **1998**, *205*, 414-419.
143. Aerts, R. J.; Van der Leer, T.; Van der Heijden, R.; Verpoorte, R. *J. Plant Physiol.* **1990**, *136*, 86-91.
144. Aerts, R. J.; Gisi, D.; De Carolis, E.; De Luca, V.; Baumann, T. W. *Plant J.* **1994**, *5*, 635-643.
145. McKnight, T. D.; Roessner, C. A.; Devagupta, R.; Scott, A. I.; Nessler, C. L. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 4939.
146. Pasquali, G.; Erven, A. S.; Ouwerkerk, P. B.; Menke, F. L.; Memelink, J. *Plant Mol. Biol.* **1999**, *39*, 1299-1310.
147. Kutchan, T. M.; Hampp, N.; Lottspeich, F.; Beyreuther, K.; Zenk, M. H. *FEBS Lett.* **1988**, *237*, 40-44.
148. McKnight, T. D.; Bergey, D. R.; Burnett, R. J.; Nessler, C. L. *Planta* **1991**, *185*, 148-152.
149. Doireau, P.; Mérimont, J. M.; Guillot, A.; Rideau, M.; Chénieux, J. C.; Brillard, M. *Planta Med.* **1987**, *53*, 364-367.
150. Stevens, L. H.; Schripsema, J.; Pennings, E. J. M.; Verpoorte, R. *Plant Physiol. Biochem.* **1992**, *30*, 675-681.
151. Pfitzner, A.; Stöckigt, J. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1585-1588.
152. Luijendijk, T. J. C.; Stevens, L. H.; Verpoorte, R. *Plant Physiol. Biochem.* **1998**, *36*, 419-425.
153. Felix, H.; Brodelius, P.; Mosbach, K. *Anal. Biochem.* **1981**, *116*, 462-470.
154. Hemscheidt, T.; Zenk, M. H. *Plant Cell Rep.* **1985**, *4*, 216-219.
155. Blom, T. J. M.; Sierra, M.; Van Vliet, T. B.; Franke-van Dijk, M. E. I.; De Koning, P.; Van Iren, F.; Verpoorte, R.; Libbenga, K. R. *Planta* **1991**, *183*, 170-177.
156. Loyola-Vargas, V. M.; Méndez-Zeel, M.; Monforte-González, M.; Miranda-Ham, M. L. *J. Plant Physiol.* **1992**, *140*, 213-217.
157. Drapeau, D.; Blanch, H. W.; Wilke, C. R. *Planta Med.* **1987**, *53*, 373-376.
158. Hong, J.; Lee, J.; Lee, H.; Kim, D.; Hwang, B. *Biotechnol. Lett.* **1997**, *19*, 967-969.
159. Lee, C. W. T.; Shuler, M. L. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 61-71.
160. Zhao, J.; Zhu, W. H.; Hu, Q. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 673-681.
161. O'Keefe, B. R.; Mahady, G. B.; Gills, J. J.; Beecher, C. W. W.; Schilling, A. B. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 261-264.
162. Misawa, M.; Goodbody, A. E. En: *Plant Cell Culture Secondary Metabolism Toward Industrial Application*; DiCosmo, F., Misawa, M., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, **1996**; pp 123-138.
163. Zhao, J.; Zhu, W. H.; Hu, Q. *Plant Growth Regul.* **2001**, *33*, 43-49.
164. Vázquez-Flota, F.; De Luca, V. *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 1351-1361.
165. Vázquez-Flota, F.; De Carolis, E.; Alarco, A. M.; De Luca, V. *Plant Mol. Biol.* **1997**, *34*, 935-948.
166. De Luca, V.; Brisson, N.; Kurz, W. G. W. En: *Primary and Secondary Metabolism of Plants Cell Cultures II*; Kurz, W. G. W., Ed.; Springer Verlag: Berlin, **1989**; pp 154-161.
167. Vázquez-Flota, F.; De Luca, V.; Carrillo-Pech, M. R.; Canto-Flick, A.; Miranda-Ham, M. L. *Mol. Biotechnol.* **2002**, *22*, 1-8.
168. Fahn, W.; Gundlach, H.; Deus-Neumann, B.; Stöckigt, J. *Plant Cell Rep.* **1985**, *4*, 333-336.
169. Fahn, W.; LauBermair, E.; Deus-Neumann, B.; Stöckigt, J. *Plant Cell Rep.* **1985**, *4*, 337-340.
170. Dogru, E.; Warzecha, H.; Seibel, F.; Haebel, S.; Lottspeich, F.; Stöckigt, J. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1397-1406.
171. von Schumann, G.; Gao, S.; Stöckigt, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1913-1918.
172. Pfitzner, A.; Polz, L.; Stöckigt, J. *Z. Naturforsch. [C]* **1986**, *41*, 103-114.
173. Falkenhagen, H.; Stöckigt, J. *Z. Naturforsch. [C]* **1995**, *50*, 45-53.
174. St-Pierre, B.; De Luca, V. *Plant Physiol.* **1995**, *109*, 131-139.
175. De Carolis, E.; Chan, F.; Balsevich, J.; De Luca, V. *Plant Physiol.* **1990**, *94*, 1323-1329.
176. Vázquez-Flota, F.; Moreno-Valenzuela, O. A.; Miranda-Ham, M. L.; Coello-Coello, J.; Loyola-Vargas, V. M. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1994**, *38*, 273-279.
177. De Luca, V.; Aerts, R. J.; Chavadej, S.; De Carolis, E.; Alarco, A.-M. En: *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*; Singh, B. K., Flores, H. E., Shannon, J. C., Eds.; American Society of Plant Physiology: Rockville, **1992**; pp 275-284.
178. De Carolis, E.; De Luca, V. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 5504-5511.
179. De Luca, V.; Balsevich, J.; Kurz, W. G. W. *J. Plant Physiol.* **1985**, *121*, 417-428.
180. Laflamme, P.; St Pierre, B.; De Luca, V. *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 189-198.
181. Schröder, G.; Unterbusch, E.; Kaltenbach, M.; Schmidt, J.; Strack, D.; De Luca, V.; Schröder, J. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 97-102.
182. Vázquez-Flota, F. A.; St Pierre, B.; De Luca, V. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 531-536.
183. Aerts, R. J.; De Luca, V. *Plant Physiol.* **1992**, *100*, 1029-1032.
184. Vázquez-Flota, F. A.; De Luca, V. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 395-402.
185. St-Pierre, B.; Laflamme, P.; Alarco, A. M.; De Luca, V. *Plant J.* **1998**, *14*, 703-713.
186. De Luca, V.; Balsevich, J.; Tyler, R. T.; Kurz, W. G. W. *Plant Cell Rep.* **1987**, *6*, 458-461.
187. Dethier, M.; De Luca, V. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 673-678.
188. De Carolis, E.; De Luca, V. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 1093-1107.
189. De Carolis, E.; De Luca, V. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **1994**, *38*, 281-287.
190. Power, R.; Kurz, W. G. W.; De Luca, V. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *279*, 370-376.
191. Fahn, W.; Stöckigt, J. *Plant Cell Rep.* **1990**, *8*, 613-616.
192. Endo, T.; Goodbody, A. E.; Vukovic, J.; Misawa, M. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2147-2149.
193. Kutney, J. P.; Aweryn, B.; Choi, L. S. L.; Kolodziejczyk, P.; Kurz, W. G. W.; Chatson, K. B.; Constabel, F. *Heterocycles* **1981**, *16*, 1169-1171.
194. Kutney, J. P.; Boulet, C. A.; Choi, L. S. L. *Heterocycles* **1988**, *27*, 621-628.
195. Misawa, M.; Endo, T.; Goodbody, A. E.; Vukovic, J.; Chapple, C. S.; Choi, L. S. L.; Kutney, J. P. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1355-1359.
196. Smith, J. I.; Amouzou, E.; Yamaguchi, A.; McLean, S.; DiCosmo, F. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2003**, *10*, 568-575.
197. Sottomayor, M.; López-Serrano, M.; DiCosmo, F.; Barceló, A. R. *FEBS Lett.* **1998**, *428*, 299-303.
198. Kutney, J. P.; Choi, L. S. L.; Kolodziejczyk, P.; Sleigh, S. K.; Stuart, K. L.; Worth, B. R.; Kurz, W. G. W.; Chatson, K. B.; Constabel, F. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2589-2595.
199. Sottomayor, M.; De Pinto, M. C.; Salema, R.; DiCosmo, F.; Pedreño, M. A.; Barcelo, A. R. *Plant Cell Environ.* **1996**, *19*, 761-767.

200. St-Pierre, B.; Vázquez-Flota, F. A.; De Luca, V. *The Plant Cell* **1999**, *11*, 887-900.
201. Moreno-Valenzuela, O. A.; Minero-García, Y.; Brito-Argáez, L.; Carbajal-Mora, E.; Echeverría, O.; Vázquez-Nin, G.; Loyola-Vargas, V. M. *Mol. Biotechnol.* **2003**, *23*, 11-18.
202. Merillon, J. M.; Ramawat, K. G.; Chenieux, J. C.; Rideau, M. En: *VI International Congress Plant Tissue and Cell Culture*; Somers, D. A., Ed.; International Association for Plant Tissue Culture: Minneapolis, **1986**; pp 370
203. Whitmer, S.; Van der Heijden, R.; Verpoorte, R. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **2002**, *69*, 85-93.
204. Eilert, U.; Kurz, W. G. W.; Constabel, F. En: *Plant Biology. Vol. 3. Plant Tissue and Cell Culture*; Green, C. E., Somers, D. A., Hackett, W. P., Biesboer, D. D., Eds.; Alan R. Liss, Co.: New York, **1987**; pp 213-219.
205. Knobloch, K.-H.; Berlin, J. *Adv. Biotechnol.* **1981**, *1*, 129-133.
206. Toivonen, L. *Utilization of Catharanthus roseus hairy root and cell suspension cultures in plant biotechnology*; Helsinki University of Technology: Helsinki, **1992**; pp 1-93.
207. Facchini, P. J.; DiCosmo, F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, *35*, 382-392.
208. Morgan, J. A.; Shanks, J. V. *J. Biotechnol.* **2000**, *79*, 137-145.
209. Zenk, M. H.; Deus, B. En: *Proceedings 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*; Fujiwara, A., Ed.; The Japanese Association for Plant Tissue Culture: Japan, **1982**; pp 391-394.
210. Whitmer, S.; Canel, C.; Hallard, D.; Gonçalves, C.; Verpoorte, R. *Plant Physiol.* **1998**, *116*, 853-857.
211. Godoy-Hernández, G.; Loyola-Vargas, V. M. *Plant Cell Rep.* **1991**, *10*, 537-540.
212. Sáenz-Carbonell, L.; Santamaría, J. M.; Villanueva, M. A.; Loyola-Vargas, V. M.; Oropeza, C. *J. Plant Physiol.* **1993**, *142*, 244-247.
213. Vázquez-Flota, F.; Loyola-Vargas, V. M. *J. Plant Physiol.* **1994**, *144*, 613-616.
214. Godoy-Hernández, G.; Loyola-Vargas, V. M. *Plant Cell Rep.* **1997**, *16*, 287-290.
215. Moreno-Valenzuela, O. A.; Monforte-González, M.; Muñoz-Sánchez, J. A.; Méndez-Zeel, M.; Loyola-Vargas, V. M.; Hernández-Sotomayor, S. M. T. *J. Plant Physiol.* **1999**, *155*, 447-452.
216. Godoy-Hernández, G. C.; Vázquez-Flota, F. A.; Loyola-Vargas, V. M. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 921-925.
217. Vázquez-Flota, F.; Monforte-González, M.; Méndez-Zeel, M.; Minero-García, Y.; Loyola-Vargas, V. M. *Phyton* **2000**, *66*, 155-164.
218. Zhao, J.; Zhu, W. H.; Hu, Q. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 666-672.
219. Zhao, J.; Hu, Q.; Guo, Y. Q.; Zhu, W. H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55*, 693-698.
220. Balsevich, J.; De Luca, V.; Kurz, W. G. W. *Heterocycles* **1986**, *24*, 2415-2421.
221. Verpoorte, R.; Van der Heijden, R.; Memelink, J. *Transg. Res.* **2000**, *9*, 323-343.
222. Flores, H. E.; Filner, P. En: *Primary and Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*; Neumann, K. H., Barz, W., Reinhard, E., Eds.; Springer-Verlag: Heidelberg, **1985**; pp 174-186.
223. Robinson, T. *Science* **1974**, *184*, 430-435.
224. Robinson, T. *The Biochemistry of Alkaloids*; Springer-Verlag: **1981**; pp 1-11.
225. Hashimoto, T.; Yamada, Y. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1994**, *45*, 257-285.
226. Facchini, P. J.; De Luca, V. *The Plant Cell* **1995**, *7*, 1811-1821.
227. Facchini, P. J. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2001**, *52*, 29-66.
228. Dörnenburg, H.; Knorr, D. *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 674-684.
229. Constabel, F.; Gaudet-LaPrairie, P.; Kurz, W. G. W.; Kutney, J. P. *Plant Cell Rep.* **1982**, *1*, 139-142.
230. Datta, A.; Srivastava, P. S. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 135-137.
231. Endo, T.; Goodbody, A. E.; Misawa, M. *Planta Med.* **1987**, *53*, 479-482.
232. Westekemper, P.; Wieczorek, U.; Gueritte, F.; Langlois, N.; Potier, P.; Zenk, M. H. *Planta Med.* **1980**, *39*, 24-37.
233. Deus-Neumann, B.; Stöckigt, J.; Zenk, M. H. *Planta Med.* **1987**, *53*, 184-188.
234. Balsevich, J.; Bishop, G. En: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*; Kurz, W. G. W., Ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **1989**; pp 149-153.
235. Ciau-Uitz, R.; Miranda-Ham, M. L.; Coello-Coello, J.; Chí, B.; Pacheco, L. M.; Loyola-Vargas, V. M. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* **1994**, *30P*, 84-88.
236. Bhadra, R.; Ho,C.; Rosi,S.; Shanks,J.V. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* **1990**, *26*, Pt.2 69A Abstract.
237. Bhadra, R.; Vani, S.; Shanks, J. V. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 581-592.
238. Parr, A. J.; Peerless, A. C. J.; Hamill, J. D.; Walton, N. J.; Robins, R. J.; Rhodes, M. J. C. *Plant Cell Rep.* **1988**, *7*, 309-312.
239. Toivonen, L.; Balsevich, J.; Kurz, W. G. W. *Phytochem. Soc. Newsletter* **1989**, *29*, 22.
240. Peraza-Sánchez, S. R.; Gamboa-Angulo, M. M.; Erosa-López, C.; Ramírez-Erosa, I.; Escalante-Erosa, F.; Peña-Rodríguez, L. M.; Loyola-Vargas, V. M. *Nat. Prod. Lett.* **1998**, *11*, 217-224.