

BIOSINTESIS DE LA VINCRISTINA Y DE LA VINBLASTINA EN CATHARANTHUS ROSEUS ¹

ROMERO CASTILLO PRIMITIVO*, M. ROBERT*, J. REYES** y VICTOR M. LOYOLA VARGAS*.

* Deptos. de Bioquímica Vegetal y **Farmacia y Productos Naturales, DEPg., Facultad de Química, UNAM, 04510, México, D.F. + Centro de Investigación Científica de Yucatán.

¹ Con el patrocinio económico del CONACyT donativo PCCBNA-020845.

RESUMEN

Las biosíntesis de los alcaloides diaméricos vinblastina (VBL) y vincristina (VCR) provienen de la condensación de la triptamina con la secologanina, las cuales producen la strictosidina, que es el intermediario clave de la biosíntesis de los alcaloides indólicos. La condensación posterior de la catarantina con la vindolina que son dos alcaloides monoméricos, da 3',4'-dehidrovinblastina que es el intermediario clave de los alcaloides diméricos, dando finalmente la VBL y la VCR. Se hace un análisis de las enzimas conocidas de la vía y de sus implicaciones biológicas.

SUMMARY

The biosynthesis of the dimeric alkaloids, vinblastine (VBL) and vincristine (VCR), takes place when triptamine condenses with secologanine, yielding strictosidine, a key intermediary in the synthesis of indolic alkaloids. The subsequent condensation of catarantine and vindoline, both monomeric alkaloids, to produce 3',4'-dehydrovinblastine is the limiting step in order to obtain VBL and VCR. A detailed analysis of the known enzymes of this pathway and its biological implications is done.

INTRODUCCION

Catharanthus roseus es una planta que contiene casi todos los tipos de alcaloides derivados del indol, y que ha sido estudiada ampliamente en los últimos 25 años. La importancia de estos alcaloides radica en que son usados en forma amplia en el tratamiento de varios cánceres ya sea solos o combinados con otros fármacos anticancerígenos. La vincristina (VCR) y la vinblastina (VBL) difieren ligeramente en su estructura. El grupo metilo del átomo N de la vindolina en la VBL es substituido por un grupo formilo en la VCR; pero tienen diferencias profundas en su toxicidad, dosis y actividad clínica (1, 2). En algunos casos, la VCR y la VBL poseen una actividad equivalente (leucemia P-1534 y ascitos S-180) y en otros neoplasmas (sarcoma osteogénico Kidway, linfosarcoma Mecca, leucemias P388, AKR y

B82A), la VCR ha demostrado un mejor efecto citotóxico, mientras que la VBL ha sido más efectiva que la VCR en el carcinoma ascítico de Ehrlich, en el tumor ascítico de Freund, en el carcinosarcoma Walker 256 y en el melanoma B16 (3).

La dosis y la toxicidad clínica tanto de la VCR como de la VBL también son diferentes. La neurotoxicidad es el principal problema encontrado en el uso clínico de la VCR, mientras que la mielosupresión es el factor limitante con la VBL (4, 5).

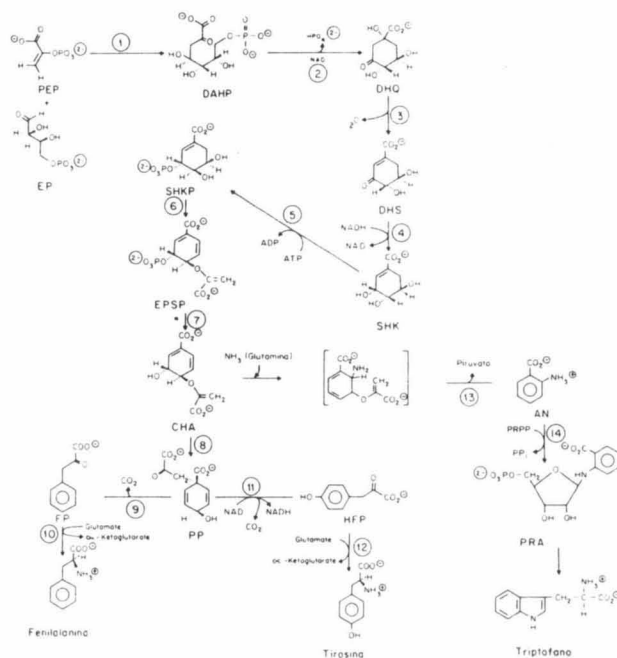


Figura 1. Biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. EP, eritrosa-4-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; DAHP, 7-fosfo-2-ceto-3-deoxiarabino-heptonato; DHQ, 5-dehidroquinato; DHS, 5-dehidroshikimato; SHK, shikimato; SHKP, shikimato-5-fosfato; 3 fosfo-5-enolpiruvil shikimato; CHA, corismato; PP, prefenato; FP, fenilpiruvato; HFP, hidroxifenil piruvato. AN, antranilato; PRA, fosforribosil antranilato; CPDP, carboxifenil amino-deoxi-ribulosa-5-fosfato; INGP, indol-3-glicerol fosfato. 1, DAHP sintasa; 2, DHQ sintasa; 3, DHQ deshidratasa; 4, shikimato deshidrogenasa; 5, shikimato cinasa; 6, PEPS sintasa; 7, corismato sintasa; 8, corismato mutasa; 9, prefenato deshidratasa; 10, 12 aminotransferasas inespecíficas; 11, prefenato deshidrogenasa; 13, antranilato sintasa; 14, antranilato fosforribosiltransferasa;

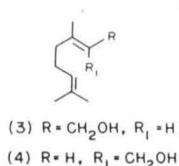
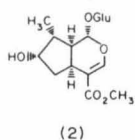
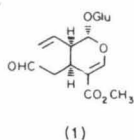
BIOSINTESIS DE LOS ALCALOIDES MONOMERICOS

El triptofano es el precursor biosintético de todos estos alcaloides, pero excepto para los alcaloides más simples, es raro que sea la única fuente de carbono. Frecuentemente varios de los carbonos son suministrados por otra fuente, tal como un monoterpeno. Es la diversidad de estructuras resultantes de este proceso lo que ha sido responsable en parte del gran interés en la biosíntesis de los alcaloides indólicos durante los últimos 15 años.

La biosíntesis del triptofano diverge de los precursores de la fenilalanina y de la tirosina en la conversión de corimato a antranilato (6). Estos precursores provienen a su vez de la eritrosa-4-fosfato y del fosfoenolpiruvato. La vía biosintética desde la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato hasta la formación del triptofano se muestra en la figura 1.

El paso inicial en la biosíntesis de los alcaloides es la condensación entre la triptamina y la secologanina, previo a este paso el triptofano es descarboxilado por medio de la triptofano descarboxilasa para dar la triptamina. La triptofano descarboxilasa es la primera enzima que canaliza el metabolito primario L-triptofano hacia la síntesis de los metabolitos secundarios. Esta enzima ha sido extraída a partir de *C. roseus* y ha sido purificada (7,8). Los datos obtenidos por el grupo de Berlín (8) indican que se trata de una proteína con un peso molecular de 115,000 daltones con dos subunidades de 54 000 daltones de peso molecular cada una y con una K_m para triptofano de 75 mM. La actividad de esta enzima parece ser uno de los factores que regulan la biosíntesis de los alcaloides en *C. roseus* (9,10).

En estudios recientes se ha demostrado que en la biosíntesis de los alcaloides, la porción de monoterpeno proviene del glucósido seco-iridoide secologanina (1) (11, 12) el cual a su vez proviene de la vía derivativa del ciclopentanoide loganina (2) (13), a partir de los monoterpenos acíclicos geraniol (3) y nerol (4) (14-16).



Las enzimas que catalizan la biosíntesis de la secologanina son: a) la geraniol-nerol hidroxilasa, b) la geraniol-nerol oxidorreductasa y c) la S-adenosil-L-metionina: ácido logánico metil-transferasa. Figura 2.

A) Geraniol-nerol hidroxilasa. Esta enzima hidroxila tanto al geraniol como al nerol para dar sus derivados 10-hidroxilados. Es una oxigenasa del grupo citocromo P_{450} . La electroforesis en geles de acrilamida de esta enzima muestra dos bandas, una con un peso molecular de 63,000 daltones y la otra de 78,000 daltones. En donde la banda más ligera pudiera ser el producto de degradación proteolítica de la de

BIOSINTESIS DE ESTRICOSIDINA

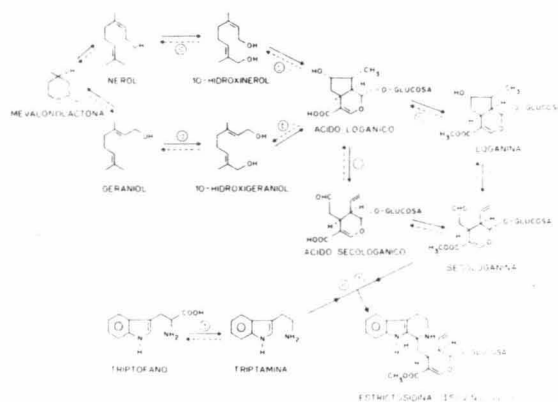


Figura 2. Biosíntesis de estricosidina. a, Geraniol nerol-hidroxilasa; b, geraniol-nerol oxidorreductasa; c, 5-adenosil-L-metionina: ácido logánico metil transferasa; d, triptofano descarboxilasa; e, f, estricosidina sintetasa.

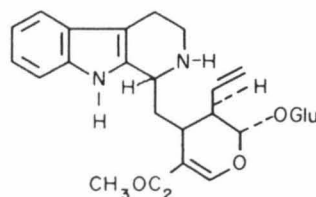
78,000 daltones. Su actividad es estimulada por flavín mononucleótido (FMN), sugiriendo que es una flavoproteína. El espectro visible confirmó el carácter de flavoproteína de la enzima (17).

Esta reductasa transfiere electrones al ferricianuro y al 2, 6-diclorofenolindofenol, así como al citocromo c. No es inhibida por actinomicina A, dicumarol, superóxido dismutasa o catarantina, pero si es inhibida por $NADP^+$ y por p-cloromercuribenzoato. Es altamente específica para la hidroxilación de los metilos C-10 del geraniol y del nerol y su acción es dependiente del NADH y no hidroliza los pirofosfatos. Esta enzima se localiza en las vacuolas o provacuolas.

B) Geraniol-nerol oxidorreductasa. Cataliza la conversión del geraniol a geranial y del nerol a neral, en la presencia de NAD^+ o $NADP^+$ y la reacción reversa cuando se utiliza el NADH o el NADPH. Esta oxidación puede estar involucrada en la biosíntesis, quizás como un intermediario entre el 10-hidroxigeraniol (o el nerol) y el ácido logánico.

C) S-adenosil-L-metionina: ácido logánico metiltransferasa. Esta enzima convierte al ácido logánico y al ácido secologánico a loganina o secologanina (sus metilésteres) y ha sido parcialmente purificada por Baxter en 1972 y Coscia en 1971 (18, 19).

La condensación de la triptamina y de la secologanina producen dos alcaloides diastereoisoméricos (5,6), los cuales se encuentran en la naturaleza, pero sólo uno de ellos actúa como precursor biogénico de los alcaloides representativos de los tipos Corinante, Iboga y Aspidosperma.



3H
 (5): α
 (6): β

Estudios recientes en que se llevaron a cabo conversiones de la estrictosidina y del vincósido a alcaloides del tipo heteroyohimbina (20, 21), indicaron claramente que la estrictosidina es el precursor de los alcaloides 3- α -Corinante bajo las condiciones fisiológicas normales de la planta. Por esto se ha asumido que la estrictosidina es el compuesto clave en la intrincada vía metabólica que lleva a los alcaloides indólicos con diferentes estructuras.

La enzima que sintetiza la estrictosidina a partir de la triptamina y la secologanina es la estrictosidina sintetasa (a), figura 3. Esta enzima ha sido obtenida a partir de extractos libres de células de *C. roseous* por precipitación con sulfato de amonio, redisolviendo en buffer a pH 7.6 y tratándola con dextran recubierto con carbón (22).

La enzima pura es menos estable, perdiendo la mitad de su actividad en una semana a 4°C. Tiene un amplio intervalo de pH óptimo, entre 5 y 7.5, y valores de K_m de 0.46 mM para la secologanina y 0.83 mM para la triptamina. El peso molecular obtenido por filtración en gel fue de 38,000 daltones. Su actividad no es inhibida por los reactivos que se unen a los grupos sulfhidrido, ni por ninguno de los alcaloides derivados de la estrictosidina lo que sugiere que no hay regulación por retroalimentación (23).

El complejo de la ajmalicina sintetasa, la cual convierte a la secologanina y a la triptamina primero en ajmalicina y después en diferentes alcaloides, fue estudiada por Scott y Lee en 1975 (724). El pH óptimo del complejo es 6.5 y acepta un amplio número de triptaminas sustituidas como sustratos; los inhibidores fueron metales de transición

y la D-gluconolactona. El sistema parece consistir, al menos de la estrictosidina sintetasa (a), de la β -glucosidasa (b) y de una reductasa dependiente de nucleótidos de piridina (c) (25) (Figura 3).

El paso enzimático inicial incluye la acción de una β -glucosidasa (b) la cual hidroliza al glucósido alcaloidal de la estrictosidina (5) para dar una aglicona inestable (7) la cual se abre para dar un aldehído (8) (26), con una configuración 3- α (S). Este compuesto altamente reactivo (8) sufre una transformación posterior para dar la catenamina (12) como precursor de los alcaloides ajmalicina, 19-epiajmalicina y tetrahidroalstonina, figura 3.

La estrictosidina es hidrolizada por la β -glucosidasa obtenida de la almendra dulce o por tratamiento ácido que da vallesiachotamina (27), mientras que bajo las condiciones dadas en un extracto libre de células, el aldehído 4,21-dehidrocorinanteína (10) es el intermediario crucial; esto indica que existen enzimas específicas involucradas en la secuencia metabólica desde la estrictosidina hasta la catenamina. Como ya se mencionó la primera enzima que actúa sobre la estrictosidina en la vía de síntesis para producir ajmalicina es la β -glucosidasa. Por medio de cromatografía de filtración en gel del sobrenadante de 37,000 g de las semillas de *C. roseous* se determinaron cuatro isoenzimas de la β -D-glucosidasa utilizando p-nitrofenil- β -glucosidasa como sustrato (28). Dos de estas hidrolasas también fueron obtenidas a partir de cultivos de tejidos. Una de ellas tiene un peso molecular de 50,000 daltones, el cual es similar a una de las obtenidas de planta.

En un sistema libre de células de *C. roseous* el complejo de la β -glucosidasa convierte a la triptamina y a la secologanina, así como a la geissoschisina en ajmalicina (13), lo que sugiere que la geissoschisina puede tener alguna función en la biosíntesis de la ajmalicina.

Para clarificar la presencia como intermediario de la geissoschisina (X), la cual ha sido ya apoyada por experimentos *in vivo* (29,30), e *in vitro* (24), se llevaron a cabo estudios de incorporación de una mezcla de (2-¹⁴C)-triptamina y (aril-³H)-geissoschisina en la ajmalicina en un sistema libre de células (31). Los datos demostraron claramente el carácter intermediario de la geissoschisina en la biosíntesis de la ajmalicina y de la tetrahidroalstonina, aunque no se formaron cantidades significativas de 19-epiajmalicina en estas incubaciones. La geissoschisina no es convertida en ajmalicina en ausencia de las enzimas. La baja incorporación de la (3H)-geissoschisina en la ajmalicina así como su baja abundancia en la planta sugieren que siempre se encuentra unida a la enzima y también que es rápidamente convertida en otros alcaloides.

BIOSÍNTESIS DE LOS ALCALOIDES DIMERICOS

A partir de la ajmalicina se forma la catarantina (16) que es un alcaloide del tipo Iboga el cual, junto con sus derivados en la forma intermediaria correspondiente al N-óxido,

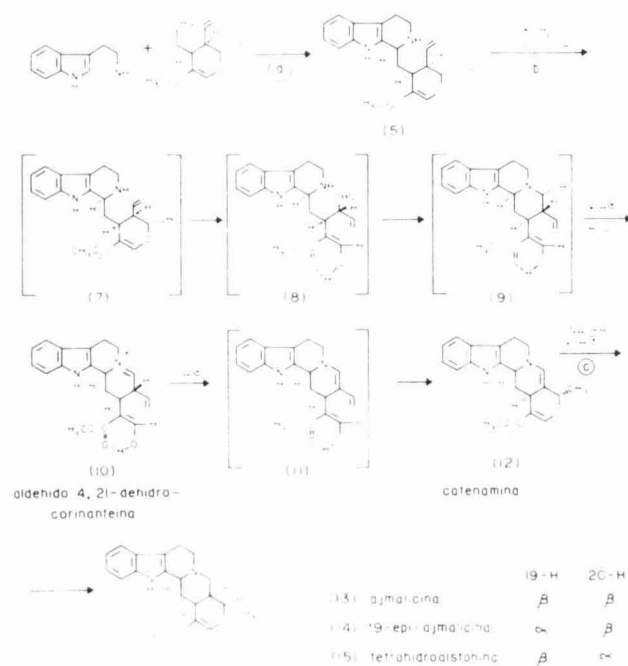


Figura 3. Biosíntesis de la ajmalicina y sus isómeros a partir de la estrictosidina, a Estrictosidina sintetasa; b, β glucosidasa.

puede acoplarse con la vindolina (17) o sus derivados para dar los sistemas bisindol requeridos para la biosíntesis de los alcaloides diméricos, figura 4. En condiciones apropiadas (32) se obtienen rendimientos altos de análogos de la VBL (60%) proveyendo por lo tanto una ruta eficiente a partir de la catarantina (16) y de la vindolina (17).

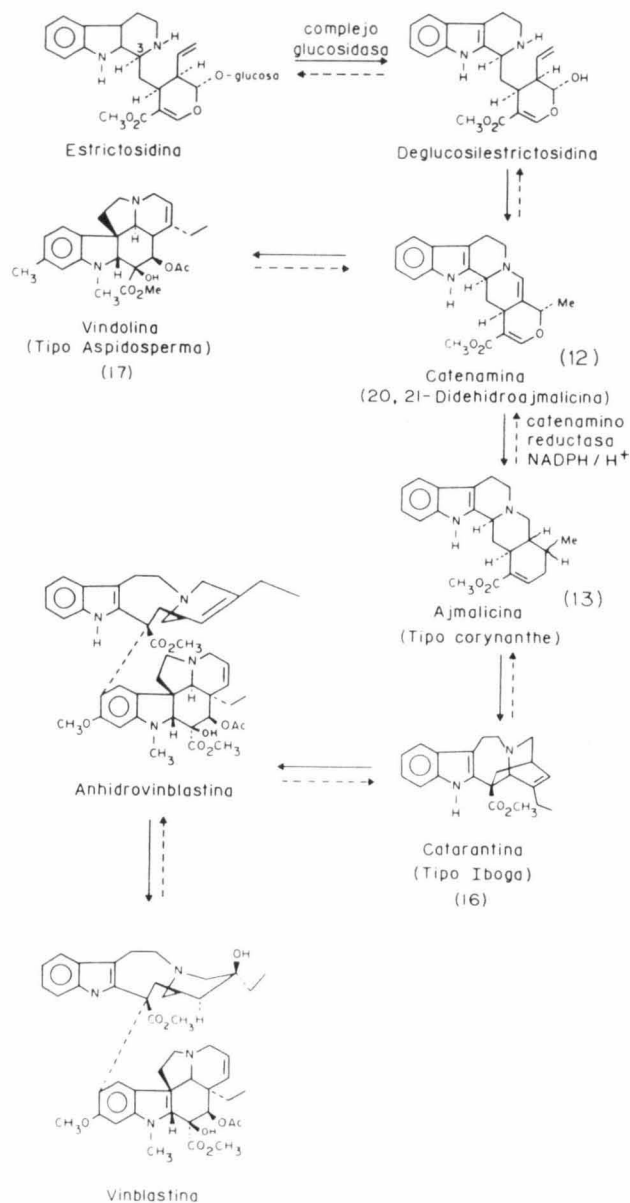


Figura 4. Biosíntesis de la vinblastina.

Los extractos libres de células de *C. roseus* también han sido utilizados para estudiar la formación de la 3'4'-dehidrovinblastina y de la leurosina a partir de la catarantina y vindolina. Se ha establecido que la 3'4'-dehidrovinblastina es un precursor de los alcaloides del grupo de la VBL (33,34).

La formación de VBL, leurosina y catarina a partir de 3'4'-dehidrovinblastina (18) ya ha sido demostrada, pero la incorporación significativa de (18) en la VCR (22) no,

por lo que se han propuesto varias rutas indirectas para su síntesis. Una de éstas, involucra una N-demetilación inicial y una formulación subsecuente a partir de la oxidación/descomposición de las aminas aromáticas terciarias por medio de las peroxidasas (35).

Una propuesta interesante para la síntesis de la VBL se muestra en la figura 5. Los modelos moleculares muestran que la hidroxiperoxindoleina (19) está orientada idealmente hacia la conversión de (20) el cual puede representar un precursor inmediato de la VBL.

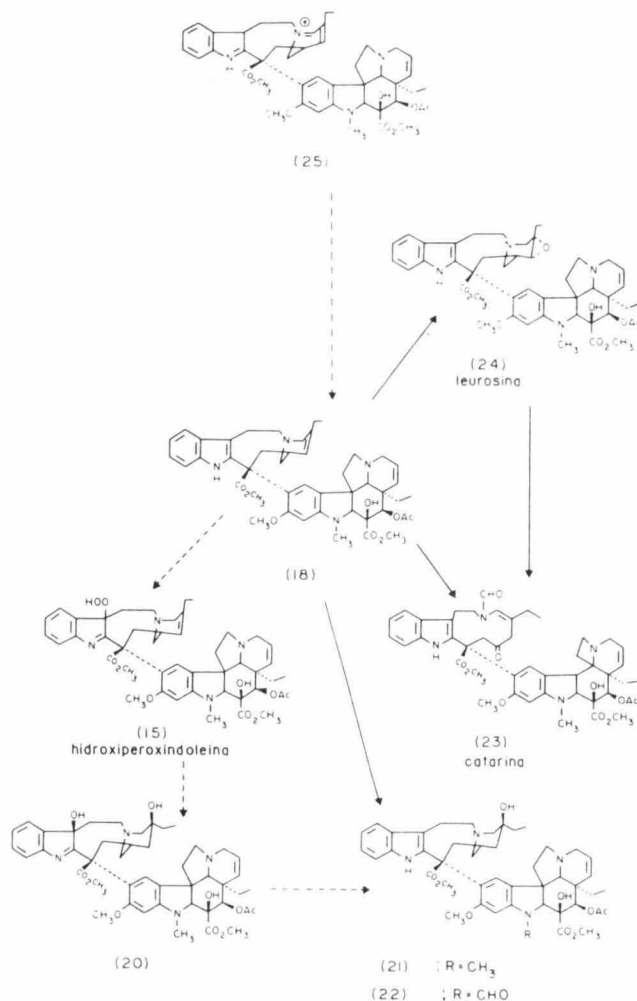


Figura 5. Vía biosintética propuesta para la síntesis de la vinblastina y de la vincristina a partir del óxido (25).

Stuart ha demostrado que la incorporación directa de las 3'4'-dehidrovinblastina en leurosina, catarina y VLB es alta. Sin embargo, después de 50 horas de incubación, sólo una cantidad insignificante se transformó en VCR (36).

La incubación de la leurosina marcada en un extracto libre de células produce un 12% de incorporación en la catarina (23), mientras que en un experimento de control, sólo se nota una conversión del 1%. Esto sugiere fuertemente que (24) es verdaderamente un producto natural y no un artefacto (37).

En resumen, las incorporaciones significativas de (18) en la VBL, leurosina y catarina apoyan fuertemente la teoría de que es en realidad el intermediario clave en la biosíntesis de los alcaloides diméricos del tipo de la VBL.

La vía hipotética propuesta por Scott (38) para la biosíntesis de los alcaloides de tipo Iboga, Aspidosperma y Esctrinos permanece sin probar ya que las pruebas de la presencia de cualquier alcaloide indólico más allá del tipo Corinante en las células cultivadas todavía no son rigurosas (39).

Observaciones recientes (40,41) muestran que la síntesis de los alcaloides del tipo Aspidosperma e Iboga, los cuales aparecen más tarde en la vía biosintética, pudieron llevarse a cabo después de que la formación de los alcaloides Corinante ha alcanzado un máximo de producción.

CONCLUSIONES

El conocimiento de la biosíntesis que da los alcaloides diméricos VBL y VCR es de suma importancia debido al interés farmacológico que tienen en el tratamiento de varios cánceres, y al objetivo actual de incrementar la producción de estos compuestos en las plantas de *C. roseus* u obtenerlos de los cultivos de tejidos vegetales (CTV). Hasta la fecha esto no se ha logrado debido a que aún no se conocen todas las enzimas de la vía y tampoco se sabe con exactitud cuales son las enzimas que regulan la síntesis de los alcaloides diméricos.

Estudios con esta finalidad se están realizando en nuestro laboratorio tanto en la planta como en los CTV ya que es de suma importancia incrementar la producción de estos alcaloides para hacerlos en un momento dado más accesibles para su producción en gran escala (42-46).

BIBLIOGRAFIA

- Greasey, W.A., (1975) en *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents* (Sartorelli, A.C. and D.G. Johns, eds.), Springer, New York, p. 670-694.
- Gerzon, J. (1981), en *Development of Anticancer Drugs Based on Natural Products Prototype* (Cassady, J.M. and J.D. Dours, eds.), Academic Press, New York, p. 271-317.
- Houghton, J.A., L.G. Williams, P.M. Torrance, (1984), *Can. Res.* 44, 582-590.
- Kosenthal, S. and S. Kaufman, (1974), *Ann. Intern. Med.*, 80, 733-737.
- Gerzon, K. Dimeric catharanthus alkaloids (1980), en: J.M. Cassady and J. D. Dours (eds.), *Anticancer Agents Based on Natural Product Models*, New York: Academic Press, p. 271-317.
- Loyola-Vargas, V.M. (1984), *Mensaje Bioquímico*, VII, 351-385.
- Scott, A.I. and S.L. Lee, (1975), *J. Ann. Chem. Soc.*, 97, 6906-6908.
- Noé, W., C. Mollenschott, and J. Berlin, (1984), *Plant Molecular Biology*, 3, 281-288.
- Knobloch, K.H., B. Hansen and J. Berlin, (1981) *Z. Naturforsch.*, 36, 40-43.
- Zenk, M.H., (1977) H. El-Shagi, H. Arens, J. Stockigt, E.W. Weller and B. Deus. *Plant Tissue culture and its biotechnological applications*, (W. Barz, E. Reinhard and M.H. Zenk, eds.), Springer-Verlag, Berlin p. 27-43.
- Battersby, A.R., A.R. Burnett and P.G. Parsons, (1968), *J.C.S. Chem. Commun.*, 1280.
- Battersby, A.R., A.R. Burnett and P.G. Parsons, (1969), *J. Chem. Soc., (C)*, 1187-1192.
- Battersby, A.R., R.T. Brown, R.S. Kapil, J.A. Knight, J.A. Martin and A.O. Plunket (1960) *J.C.S. Chem. Commun.* 888-890.
- Battersby, A.R., R.S. Kapil and R. Southgate, (1968), *J.C.S. Chem. Commun.* 131.
- Battersby, A.R., E.S. Hall and R. Southgate, (1969), *J. Chem. Soc., (C)*, 721-728.
- Brechbuhler-Bader S., C.J. Coscia, P. Loew, Ch. Von Szczepanski and D. Arigoni, (1968), *J.C.S. Chem. Commun.*, 136-139.
- Madyastha, K.M. and C.J. Coscia, (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 2419-2427.
- Baxter C. and M. Slaytor, *Phytochem.* 11, 2763-2766.
- Coscia, C.J., K.M. Madyastha and R. Guarnaccia, (1971), *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, 30, 1472.
- Brown, R.T., J. Leonard and S.K. Sleight, (1977), *Chem. Commun.*, 636-638.
- Brown, R.T., J. Leonard and S.K. Sleight (1978), *Phytochem.*, 17, 899-900.
- Stöckigt, J. (1979), *Phytochem.* 18, 965-971.
- Mizukami, H., H. Nordioev, S.L. Lee and A. I. Scott, (1979), *Biochem.* 18, 3760-3763.
- Lee, S.L., K.D. Cheng and A.I. Scott, (1981), *Phytochem.*, 1841-1843.
- Treimer, J.F. and M.R. Zenk, (1978), *Phytochem.* 17, 227-232, (1978).
- Battersby, A.R., A.R. Burnett and P.G. Parsons, (1969), *J. Chem. Soc., (C)*, 1193-1200.
- Brown, R.T., J. Leonard and S.K. Sleight, (1977), *J.C.S. Chem. Commun.*, 636.
- Scott, A.I., S.L. Lee and W. Wan, (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75, 1004-1009.
- Scott, A.I., P.C. Cherry and A.A. Qureshi, (1969), *J. Amer. Chem. Soc.*, 91, 4932-4933.
- Battersby, A.R. and E.S. Hall, (1969), *J.C.S. Chem. Commun.*, 793-794.
- Lee, S.L., T. Hirata and A.I. Scott, (1979) *Tetrahedron Lett.*, 8, 691-694.
- Kutney, J.P., T. Hibino, E. Yahngen, T. Okutami, A.H. Ractcliffe and S. Wunderly, (1976), *Helv. Chim. Acta*, 59, 2858-2882.
- Stuart, K.L., J.P. Kutney, T. Honda, N.G. Lewis and B.R. Worth (1978), *Heterocycles*, 9, 647-652.
- Stuart, K.L., J.P. Kutney and T. Honda (1978), *Heterocycles*, 9, 1419-1426.
- Galliani, G., B. Rindore and A. Marchesini (1976), *J.C.S. Perkin I*, 456.
- Stuart, K.L., J.P. Kutney, T. Honda and B.R. Worth (1978), *Heterocycles*, 9, 1391-1395.
- Kutney, J.P., J. Balsevich and B.R. Worth, (1978), *Heterocycles*, 9, 493.
- Scott, A.I. (1970), *Accounts Chem. Res.*, 3, 151-157.
- Scott, A.I., H. Mizukami, T. Hirata (1980) *Phytochem.*, 19, 488-489.
- Kurz, W.G.W., K.B. Chatson, F. Constabel, J.P. Kutney, K.I. Stuart, S.K. Sleight (1980) *Helv. Chim. Acta*, 63, 1891-1896.
- Kurz, W.G.W., K.B. Chatson, F. Constabel, J.P. Kutney, K.L. Stuart, S.K. Sleight (1976) *Planta Médica*, 42, 22-31.
- Carrillo, S.A., Informe servicio social, Biólogo, UAM-I, (1984).
- Gómez, I.N., Tesis, Fac. Química, UNAM, (1984).
- López, B.M.E., Tesis, Fac. Química, UNAM, (1984).
- Romero, P.C., Tesis, Fac. Química, UNAM, (1984).
- Loyola-Vargas, V.M., (1984), *Rev. Mex. Ciencias Farm.*, 14, 26-36.

