



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS DE ALCALOIDES EN
FRUTO Y SEMILLA DE *Argemone mexicana* L.**

Tesis que presenta

JOSÉ IGNACIO LAINES HIDALGO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México
2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de José Ignacio Laines Hidalgo titulado “

Análisis de la síntesis de alcaloide en fruto y semilla de *Argemone mexicana*” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas, línea de investigación: Metabolismo secundario, Laboratorio 25 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Celia de la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 11 de abril de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Lic. José Ignacio Laines Hidalgo

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología molecular de plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Localización de los sitios de síntesis y acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* L (chicalote), financiado por el Fondo de Investigación Científica Básica de CONACYT (285887), bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y su programa de posgrado en Ciencias Biológicas. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada (815650) para la realización de mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento al proyecto: Localización de los sitios de síntesis y acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* L (chicalote) con clave 285887.

Al director de tesis y amigo, el Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, por hacerme formar parte en su laboratorio a cargo; así como la oportunidad de contribuir a su grupo de trabajo. Gracias por compartir todo su profesionalismo, por cada consejo, y disposición durante la realización de este proyecto.

A la M. en C. Miriam del Socorro Monforte Gonzáles, por sus grandes enseñanzas para desarrollar la lógica, orden y profesionalismo en cada experimento. Gracias por su amistad y sus consejos.

Al comité tutorial y revisor, Integrado por el Dr. Gregorio del Carmen Godoy Hernández, el Dr. Jorge Rubio Piña, el Dr. Gumersindo Mirón López y a la Dra. Renata Rivera Madrid, a cada uno, gracias por su valioso tiempo, disposición y cada consejo que contribuyó en mucho para la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Yajaira Tamayo Ordoñez, gracias por cada valiosa sugerencia. Que sin duda alguna, fue de gran ayuda en la realización de este trabajo. Mi admiración y mi respeto para usted.

DEDICATORIAS

Al que sustenta mi vida, a mi buen Dios, porque por El fueron creadas todas las cosas.

A mis padres, Neftalí Laines Moreno y Dolores Hidalgo Gonzáles, luchadores incansables, los amo tanto. Son para mí lo más valioso en la vida.

A mis amigos, Federico García, Gilberto Muñoz, Sergio García y Fanny Cámara. Ustedes son mi segunda familia.

A mis compañeros del laboratorio 25, Lloyd Loza Müller, Mary José Rozete Navarro, Neptis Estrada Alfaro, Ángel Córdova Alvarado, Alain Reyes Guerrero, Karen Villanueva Trujillo, y en especial a Zurizadai Escobar Chan. Gracias por los consejos, el apoyo moral y por ese entusiasmo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I	4
ANTECEDENTES	4
1. 1 <i>Argemone mexicana</i> L.....	4
1.2 Importancia de los ABIs.....	6
1.3 Distribución de los ABIs en distintas especies.....	7
1.4 Biosíntesis de los ABIs.....	8
1.5 Tráfico y acumulación de los ABIs a nivel celular y de tejido específico.....	12
1.6 La acumulación de alcaloides en tejidos específicos de algunas especies.....	17
1.7 Distribución de los alcaloides en <i>A. mexicana</i> y su relación con la actividad transcripcional.....	18
1.8 Síntesis de alcaloides durante el desarrollo de frutos.....	19
1.9 Alcaloides en frutos de papaveráceas.....	23
1.10 Anatomía del fruto de <i>A. mexicana</i>	24
1.11 Recapitulación de los antecedentes.....	27
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. HIPÓTESIS.....	30
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
CAPÍTULO II	32
MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.1 Material vegetal.....	32
2.2 Determinación de los estadios de desarrollo.....	33
2.3 Cambios durante el desarrollo del fruto.....	33
2.4 Extracción de los alcaloides.....	33
2.5 Análisis de la presencia de alcaloides en la testa de semillas maduras de <i>A. mexicana</i>	34
2.6 Análisis de expresión de <i>NCSam1</i> , <i>NCSam2</i> , <i>BBEam 1</i> , <i>BBEam2</i> , <i>CheSyn</i> , <i>StySyn</i> y <i>SOMT</i>	34
2.7 Extracción de ARN.....	34
2.8 Síntesis de cDNA.....	35
2.9 PCR.....	35
CAPÍTULO III	36
RESULTADOS	36
3.1 Caracterización del desarrollo del fruto y semilla de <i>A. mexicana</i>	36
3.2 Caracterización del desarrollo de las capsulas de <i>A. mexicana</i>	39
3.3 Acumulación de berberina y sanguinarina durante el desarrollo de frutos de <i>A. mexicana</i>	42
3.4 Análisis moleculares en la biosíntesis de alcaloides en frutos de <i>A. mexicana</i>	45
3.5 Estudio de la liberación de alcaloides en semillas de <i>A. mexicana</i>	46

CAPITULO IV	49
Discusión general de los resultados.....	49
CAPITULO V	52
CONCLUSIONES.....	52
5.1 Modelo integrativo.....	52
5.2 perspectivas.....	53
BIBLIOGRAFÍA	55

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Planta adulta de <i>Argemone mexicana</i> .	5
Figura 1.2. Distribución de los alcaloides mayoritarios berberina y sanguinarina en los distintos tejidos de <i>A. mexicana</i> .	6
Figura 1.3. Distribución por especie de los ABIs.	8
Figura 1.4. Ejemplos de distintos grupos de ABIs.	9
Figura 1.5. Primera etapa de la ruta de biosíntesis de ABIs.	10
Figura 1.6. Segunda etapa de la biosíntesis de ABIs.	10
Figura 1.7. Ruta específica para la biosíntesis de berberina y sanguinarina.	12
Figura 1.8. Distribución los intermediarios y la localización de las enzimas para la síntesis de sanguinarina en <i>Papaver somniferum</i> .	13
Figura 1.9 Modelo de localización celular que muestra la participación de las células acompañantes, los elementos cribosos y las células laticíferas en la biosíntesis de la morfina en <i>P. somniferum</i> .	14
Figura 1.10 Acumulación de berberina en la endodermis de raíces de <i>T. flavum</i> .	15
Figura 1.11 La localización específica de las enzimas participantes y / o los transcritos para la biosíntesis de alcaloides en tejidos de diversas especies.	16
Figura 1.12. La acumulación de alcaloides en tejidos específicos.	17
Figura 1. 13. Abundancia de sanguinarina y berberina en tejidos de <i>A. mexicana</i> .	18
Figura 1.14. Distribución y abundancia relativa de transcritos biosintéticos de alcaloides en tejidos de <i>A. mexicana</i> .	19
Figura 1.15. Medición de los alcaloides escopolamina y atropina durante el desarrollo de frutos y semillas de <i>D. stramonium</i> .	20
Figura 1.16. Distribución de alcaloides durante el desarrollo de <i>A. catechu</i> .	20
Figura 1.17 contenidos de cafeína y actividad transcripcional durante el desarrollo del fruto de las especies <i>C. arabica</i> y <i>C. canephora</i> .	21
Figura 1.18. Contenidos de berberina en el desarrollo del fruto en tres especies de <i>Berberis</i> .	22
Figura 1.19. Contenido de sanguinarina en etapas de desarrollo de <i>S. canadensis</i> .	23
Figura 1.20. Anatomía del fruto de <i>A. mexicana</i> .	25
Figura 1.21. Morfología de la semilla de <i>A. mexicana</i> .	26
Figura 1.22. Estrategia experimental.	31
Figura 2.1. Tejidos empleados para el análisis de alcaloides y de ácidos nucleicos. En la parte superior se muestran las capsulas de <i>A. mexicana</i> .	32
Figura 3.1 Tiempo del desarrollo de la flor y fruto de <i>Argemone mexicana</i> y la determinación de los estadios.	37
Figura 3.2 Caracterización de las semillas durante el desarrollo del fruto de <i>A. mexicana</i> .	38
Figura 3.3 Perfil de crecimiento de la cápsula completa de <i>A. mexicana</i> y los tejidos que la componen (pericarpio, PR, semillas, SE y septum intralocular; SI) estimado en valores de peso fresco.	40
Figura 3.4 Perfil de crecimiento de la cápsula completa de <i>A. mexicana</i> y sus componentes (pericarpio, PR, semillas, SE y septum intralocular; SI) estimado en valores de peso seco.	41
Figura 3.5. Acumulación de alcaloides en pericarpio durante el desarrollo de frutos de <i>A. mexicana</i> .	42
Figura 3.6. Acumulación de alcaloides en septum intralocular durante el desarrollo de frutos de <i>A. mexicana</i> .	43

Figura 3.6. Acumulación de alcaloides en semillas durante el desarrollo de frutos de <i>A. mexicana</i>	44
Figura 3.7 Análisis moleculares en tejidos del fruto de <i>A. mexicana</i>	46
Figura 3.8. Lavados de semillas con distintos disolventes.	47
Figura 3.9. Extracción de alcaloides de a partir de semillas lavadas con distintos solventes.....	48
Figura 5.1 modelo integrativo en la síntesis de alcaloides en frutos de <i>A. mexicana</i> en la etapa inmadura (izquierda) y en la etapa madura (derecha).....	53

ABREVIATURAS

ABIs:	alcaloides bencilisoquinolinicos
DNA:	deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
cDNA:	complementary DNA (ADN complementario)
ARN	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
BBE:	enzima puente de berberina
CCF:	cromatografía de capa fina
CheSyn:	quelantifolina sintasa
dNTP:	dexosirribonucleotidos trifosfatos
E1:	estadio 1
E2:	estadio 2
E3:	estadio 3
E4:	estadio 4
E5:	estadio 5
E6:	estadio 6
E7:	estadio 7
FC:	fruto completo
MeOH:	metanol
NCS:	norcoclaurina sintasa
PA:	post-antesis
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PR:	pericarpio
SE:	semilla
SI:	septum intralocular
SOMT:	escoulerina-9-O-metil transferasa
StySyn:	estilopina sintasa

RESUMEN

Argemone mexicana L., es una planta de uso medicinal, probablemente por la presencia de diferentes alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs). Los alcaloides mayoritarios son berberina (protoberberina) y sanguinarina (benzofenantridinas). La berberina se distribuye en todos los tejidos de la planta, mientras que la sanguinarina es predominante en raíces y en semillas maduras. Las semillas también pueden acumular berberina en etapas inmaduras. Se desconoce el origen de los alcaloides en las semillas de esta planta. Si bien la sanguinarina, pudiera transportarse desde la raíz a las semillas a través del tejido vascular, este alcaloide no se ha encontrado en los tallos ni en el látex que de éste emana. Como alternativa, la síntesis de estos alcaloides pudiera ocurrir en los tejidos del fruto que acumulan cantidades importantes de berberina, y cuya síntesis comparte los pasos iniciales con la de sanguinarina.

Para poder responder esta cuestión, se realizó un estudio detallado en los distintos tejidos de la capsula desde las etapas de botones florales hasta de las de frutos dehiscentes. Los frutos se separaron en pericarpio, septum intralocular y semillas, a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo y se incluyeron análisis de la acumulación de alcaloides, así como de algunos transcritos correspondientes a genes involucrados en la biosíntesis de sanguinarina y berberina. Los resultados muestran que el pericarpio y el septum intralocular son tejidos que acumulan berberina durante todo el desarrollo del fruto. En la semilla es posible hallar ambos alcaloides cuando ésta inicia la etapa de maduración, detectada como pardas. No obstante, en el estado maduro (cuando las semillas son oscuras) sólo se encuentran la sanguinarina. Por su parte, el análisis de *NCSam1*, *NCSam2*, *BBEam1* y *BBEam2*, que forman parte de las reacciones comunes y de *SOMT*, específico para la síntesis de berberina, así como *StySyn* y *CheSyn*, que participan de manera exclusiva en la formación de sanguinarina; los resultados sugieren que la síntesis de berberina en semillas inmaduras podría ocurrir de manera *ex situ*, donde la berberina es sintetizada en el pericarpio y movilizada hasta la semilla. Sin embargo, la síntesis de sanguinarina sí podría ocurrir en las propias semillas maduras, al menos de manera parcial, puesto que en esta etapa se pueden detectar los transcritos correspondientes a enzimas de tanto tramo común de la ruta de síntesis, así como aquellos involucrados únicamente en la formación de sanguinarina.

ABSTRACT

Argemone mexicana L., is a medicinal plant that produces different benzyloquinoline alkaloids (BIAs), including berberine (protoberberine) and sanguinarine (benzophenanthridines). Berberine distributes through all plant tissues, while sanguinarine is restricted to roots and mature seeds. Both alkaloids share the same intermediaries along the initial track of the biosynthetic pathway. In seeds, berberine is detected at immature stages, whereas sanguinary is the predominant alkaloid at mature stages. It remains unknown if seed alkaloids are *in situ* formed or imported from other tissues. Although sanguinarine could be transported from roots through vascular tissues, it has not been detected in stem tissues, neither in the latex that emanates from it. As an alternative, pericarps from the capsule fruit, which accumulate berberine could act as the source tissue since both berberine and sanguinarine share the same intermediaries along the initial track of the biosynthetic pathway.

This work presents a study of the different tissues of the capsule fruit including pericarp, intralocular septa and seeds. Alkaloid accumulation and selected transcripts, involved in alkaloid synthesis, were followed throughout the complete development process, from floral buttons to dehiscent capsules. Results showed the presence of berberine in pericarp and intralocular septum throughout all development stages. Interestingly, berberine was detected simultaneously with sanguinarine in immature seeds, although later, when at maturity, seeds did this darkened; only the latter was present. The analysis of transcripts involved at the common early biosynthetic reactions: *NCSam1*, *NCSam2*, *BBEam1* and *BBEam2*, as well as *SOMT*, specific to berberine, and *StySyn* together with *CheSyn*, corresponding to specific reactions leading to berberine and sanguinarine, respectively, suggested that berberine synthesis in immature seeda could occur in external tissues, such as pericarps. On the other hand, sanguinarine formation could take place *in situ*, in the same mature seeds, since transcripts from both early and late biosynthetic phases were detected.

INTRODUCCIÓN

Argemone mexicana L (Papaveraceae) produce los alcaloides sanguinarina y berberina (Chang, Y., et al, 2003). La berberina se encuentra presente en cantidades importantes en todos los tejidos de la planta y en bajos niveles en las semillas de estado inmaduro. En plantas adultas, la sanguinarina, sólo se presenta en raíz y en semillas maduras; mientras que en plántulas jóvenes puede encontrarse también en las partes aéreas (Rubio-Piña, 2009; Vázquez-Flota et al., 2018). Se desconoce el origen de la sanguinarina presente en las semillas maduras. Uno de los posibles orígenes de este alcaloide podría ser mediante el transporte partiendo de la raíz movilizándose por medio de tejidos vasculares hasta acumularse en la semilla. No obstante, no se ha detectado la presencia de dicho alcaloide en tejidos de tallo, ni en el látex que de éste emana (Carrillo-Pech, 2006; Frick *et al.*, 2005). Otro posible origen es la participación del fruto en la formación de estos alcaloides. El fruto es un tejido también capaz de producir alcaloides, principalmente berberina y, considerando que la biosíntesis de sanguinarina y berberina comparten intermediarios comunes en la fase temprana, es posible que en algún punto dichos intermediarios puedan dirigirse en la síntesis de sanguinarina. Finalmente, la propia semilla puede ser el origen de los alcaloides acumulados en las mismas. En este trabajo se propone realizar este estudio, separando el fruto en sus diferentes tejidos como pericarpio, septum intralocular (placenta) y semillas a lo largo de diferentes etapas de su desarrollo incluyendo el análisis de la acumulación de alcaloides, así como de transcritos correspondientes a genes seleccionados en su biosíntesis.

CAPÍTULO I**ANTECEDENTES****1. 1 *Argemone mexicana***

La flora mexicana es una de las más diversas del mundo siendo también reconocida por abundantes plantas empleadas con fines curativos. Una de estas plantas es *Argemone mexicana* (papaveraceae), comúnmente nombrada como cardosanto (Martinez M. 1979). El nombre del género *Argemone*, deriva de la palabra griega ($\alpha\rho\gamma\epsilon\mu\alpha$; *Argema*), que significa cataratas oculares, y se eligió en referencia a su parecido a las flores de la celedonia (*Chelidonium majus*) otra planta papaveraceae, utilizada para tratar tal condición en la antigua Grecia (Piña-Rubio y Vázquez-Flota, 2013). Algunos autores sugieren que pinturas representadas en los murales de la zona de Teotihuacán corresponden a plantas de *A. mexicana*, y en dichas representaciones muestran escenas donde se realizan procedimientos médicos utilizando una planta con hojas crujientes, flores amarillas y cápsulas redondas, semejantes a las de la amapola de opio.

A. mexicana (figura 1.1) es una planta anual, una herbácea con un tallo monopoidal erecto con abundantes espinas. La altura de la planta es cerca de 1 m, sus hojas son de color verde-azulado, con forma lobuladas y en cada lóbulo presenta una espina en el ápice (Bosh C., 2007), los nodos son multilacunares (Ezalarab y Dormer 1966). Los estomas pueden estar presentes tanto en la parte superior como en la inferior de la hoja. Los de la superficie inferior sólo son anamocíticos (Kidwai 1972). La flor de esta planta posee sépalos con espinas en el ápice y seis pétalos amarillos. Las anteras son bidimensionales y abiertas por dos hendiduras longitudinales. Las flores son hipóginas. El gineceo de las Papaveraceae es sincárpico y consta a veces de más 20 carpelos. Las cápsulas son espinadas y dentro de éstas se producen semillas redondas y negras. La raíz es de tipo pivotante y de toda la planta se emana un látex de color amarillo. Este látex se puede encontrar tanto en articulaciones tardías como en anastomosis. (Pitty A. y Muñoz R. 1993; Rubio Piña y Vázquez flota, 2013). Los nombres comunes con los que se le puede referir a *A. mexicana* son el de amapola montés, amapolill, chicalote o cardosanto. Esta planta crece en climas tropicales y subtropicales. Está bien adaptada para crecer en suelos pobres en nitrógeno, y ser tolerante tanto a la sequía como a la salinidad, brindándole pocas restricciones ambientales para propagarse (Tamado & Milberg 2000). Se le puede encontrar como flora arvense y vegetación secundaria en áreas de cultivo abandonadas, pastizales y orillas de carreteras.

La importancia de esta planta surge por su uso medicinal, ya que a lo largo de la historia diversas culturas lo empleaban para el tratamiento de nubes o cataratas para aliviar la fiebre, la sarna, como purgante y en ciertas enfermedades cutáneas, todas dependiendo del tejido empleado (Lozoya, X. 1999). La presencia de alcaloides en diferentes partes de la planta puede explicar las propiedades medicinales que se le atribuyen como aplicaciones para terapias anticancerígenas, para actividad antimicrobiana y entre otras (Chang, Y., et al, 2003).



Figura 1.1. Planta adulta de *Argemone mexicana*. Esta planta presenta un tallo erecto con una altura cerca de 1 m y cuenta con abundantes espinas. Sus hojas son de color verde-azulado, con forma lobuladas y en cada lóbulo presenta una espina (Pitty A. y Muñoz R. 1993; Rubio Piña y Vázquez flota, 2013).

Los alcaloides presentes en *A. mexicana* son del grupo de los bencilisoquinolínicos (ABIs), derivados de la tirosina y típicos de las papaveraceas. En *A. mexicana* los alcaloides mayoritarios son la berberina (protoberberina) y la sanguinarina (benzofenatridina) (figura 1.2). La berberina está distribuida en todos los tejidos e inclusive en semillas de estado inmaduro. La sanguinarina tiene presencia en raíz y en semillas maduras (Rubio-Piña, 2009; Lozoya y Lozoya, 1982). En *A. mexicana* también se pueden encontrar otros alcaloides como la reticulina, metilcoclaurina, criptopina, queleritrina, dihidrosanguinarina, protopina, alocriptopina y los alcaloides minoritarios como quelantifolina, dihidroqueleritrina, norqueleritrina, coptisina, norsanguinarina, por mencionar algunos (Guizar-González et al. 2012; Rajvaidhya et al., 2012).

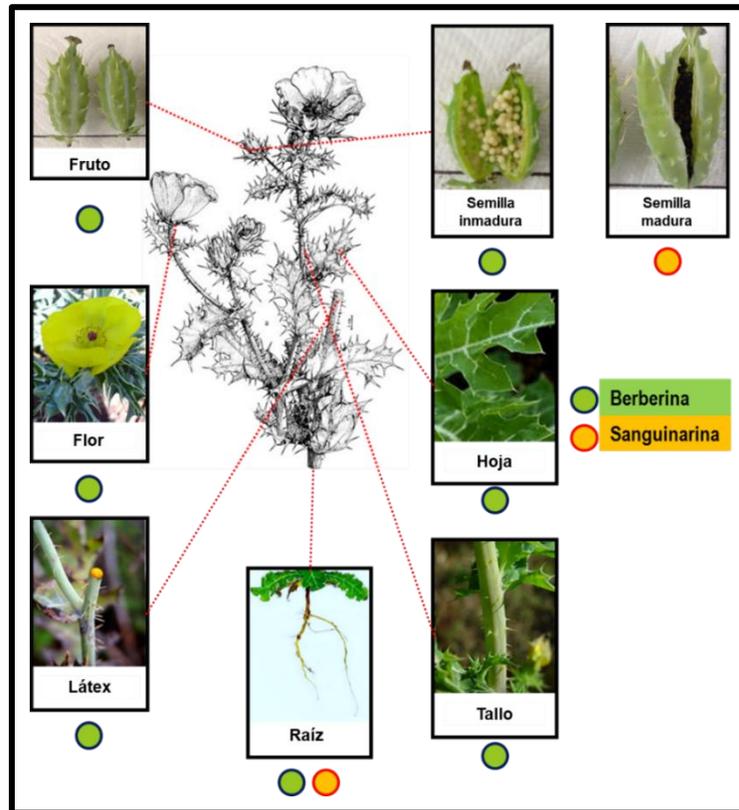


Figura 1.2. Distribución de los alcaloides mayoritarios berberina y sanguinarina en los distintos tejidos de *A. mexicana*. La berberina está distribuida en todos los tejidos e inclusive en semillas de estado inmaduro. La sanguinarina tiene presencia en raíz y en semillas maduras (Rubio-Piña, 2009; Lozoya y Lozoya, 1982).

1.2 Importancia de los ABIs

Los ABIs representan aproximadamente 2500 estructuras ya elucidadas. La importancia de los ABIs ha surgido debido a que poseen múltiples propiedades farmacológicas potentes. Estos estudios iniciaron con la purificación de la morfina en 1806, a partir del látex de *Papaver somniferum*, marcando el primer aislamiento de un alcaloide (Serturmer, 1806). La morfina se ha empleado como analgésico y narcótico, la codeína como supresor de la tos, la papaverina como relajante muscular, y la sanguinarina junto con berberina como agentes antimicrobianos (Hagel y Facchini 2013). De manera detallada las aplicaciones para berberina han sido vinculadas para generar un efecto citotóxico que induce la apoptosis en células cancerígenas, también se le atribuye actividad para tratamiento cardiovascular y contra la hiperglucemia (Chou et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Más allá de sus aplicaciones farmacéuticas, la berberina también exhibe una potente actividad contra insectos depredadores como las larvas de la polilla gitana (*Lymantria dispar*) (Shields y col. 2008), escarabajos adultos de las hojas (*Agelastica coerulea*) (Park et al., 2000), la mosca de la fruta (*Drosophila melongaster*) (Sellier et al. 2011), así como reducción del crecimiento y supervivencia de larvas (Krug y Proksch 1993), conduciendo a la generación de insecticidas comerciales (Shields y col. 2008). Por su parte la sanguinarina se emplea para la generación de tratamientos quimioterapéuticos y promotores del sistema inmune contra los carcinomas (Rubio-Piña y Vazquez-Flota; 2013). También la sanguinarina se ha empleado en la generación de tratamientos contra la formación de la placa dentobacteriana, expectorante, tratamientos contra la leucemia, entre otros (Ahmad et al., 2000; Roberts, 2013). Con relación a sus propiedades antimicrobianas, se sugiere que la función de los ABIs en las plantas es la de protección contra herbívoros y agentes patógenos. (Schmeller et al., 1997; García et al., 2006M; Osho y Adetunji, 2010). Muchas plantas, tal es el caso de las Papaveraceas, invierten considerables recursos para la producción de estos alcaloides, por lo que sugiere que estos componentes juegan un papel relevante en la fisiología y desarrollo de la planta (Schmeller et al., 1997; Wink et al., 1998).

1.3 Distribución de los ABIs en distintas especies

Los alcaloides ABIs se producen principalmente en la familia *Annonaceae* *Aristolochiaceae*, *Berberidaceae*, *Magnoliaceae*, *Menispermaceae*, *Ranunculaceae*, y *Papaveraceae* (género de *Argemone*). Los alcaloides de tipo benzofenantridina son típicos de la especie Papaverácea, mientras que, los de tipo protoberberina se distribuyen en distintas familias. En especies como *Eschscholzia californica* (*papaveracea*) se ha identificado la presencia única de sanguinarina mientras que, en otros grupos de plantas, como *Coptis japónica* (*Renuncalaceae*), *Berberis wilsoniae*, (*Berberidaceae*) y *Fibraurea tinctoriase* (*Menispermaceae*) son productores de berberina y otras protoberberina, pero no son productores de benzofenantridinas (figura 1.3). Una de las especies que se han identificado ambos tipos de alcaloides benzofenantridinas (sanguinarina) y protoberberina (berberina) se trata de *A. mexicana*. De este modo, esta planta tiene una doble capacidad biosintética para producir alcaloides distribuidos espacialmente en distintas familias. *A. mexicana* tiene una versatilidad metabólica y es óptima para la producción de fármacos. *P. somniferum*, *Californica eschscholzia*, *Thalictrum flavum* y *C. japonica* son especies ampliamente investigadas.

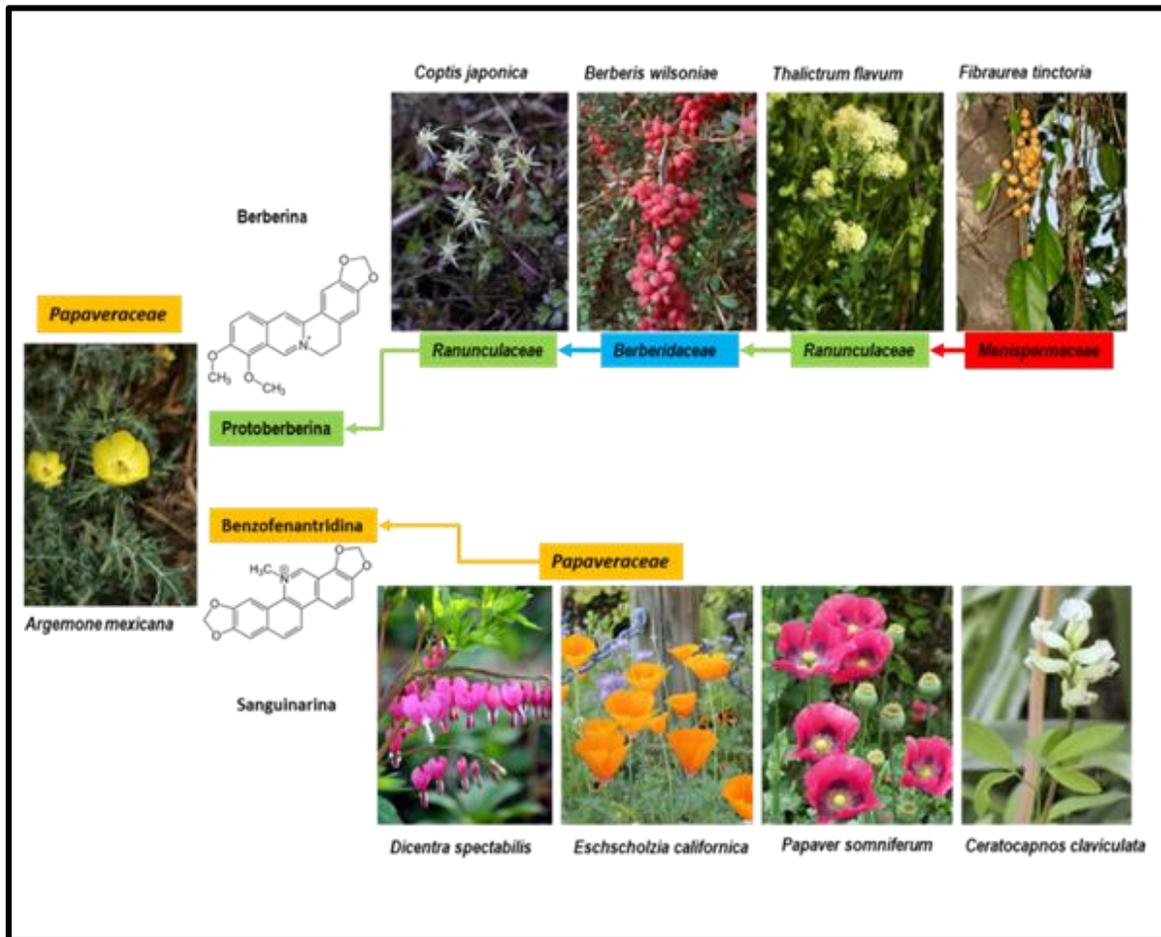


Figura 1.3. Distribución por especie de los ABIs. Los ABIs de tipo benzofenantridina son típicos en especies de la familia papaverácea, mientras que los de tipo protoberberina se distribuye en distintas familias. *A. mexicana* es una especie que tiene una doble capacidad biosintética para producir alcaloides distribuidos espacialmente en distintas familias.

1.4 Biosíntesis de los ABIs

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos nitrogenados de carácter básico de donde se deriva su nombre “alkali”. La clasificación de estos compuestos es basada en el esqueleto químico de su precursor. Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs) se forman a partir de tirosina y representan una de las familias más diversas de alcaloides. Estos se caracterizan por presentar un esqueleto carbonado básico que proviene de un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro anillo bencilo (figura 1.4) (Facchini et al., 2000).

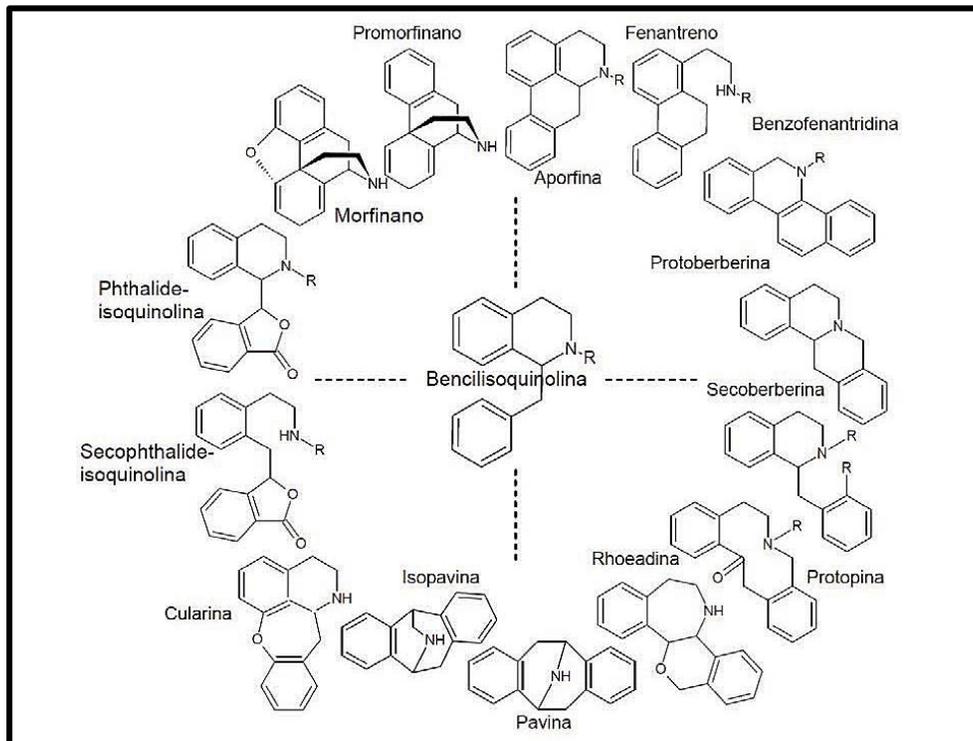


Figura 1.4. Ejemplos de distintos grupos de ABIs. Estos alcaloides se caracterizan por presentar un esqueleto carbonado básico que proviene de un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro anillo bencilo. Tomado de Riley-Saldaña *et al.*, 2012.

El inicio de la ruta de biosíntesis de los ABIs (figura 1.5) implica la condensación de dos moléculas derivadas de la tirosina. La ruta biosintética inicia con la descarboxilación de la tirosina para producir tiramina, esta reacción es llevada a cabo por la tirosina-d Descarboxilasa (TYDC). La tiramina es convertida en dopamina por acción de la monofenoloxidasas (MFO). Otra molécula de tiramina es convertida en 4-hidroxifenil acetaldehído por una monoaminoOxidasa (MAO). La dopamina y la 4-hidroxifenil acetaldehído son acoplados por una reacción de condensación catalizada por la norcoclaurina sintasa (NCS), la formación de norcoclaurina es la primera etapa en la vía de la biosíntesis que se encuentra comprometida. En la siguiente fase de la ruta biosintética (figura 1.6), la (S)-norcoclaurina se convierte en (S)-reticulina mediante una serie de reacciones que incluyen tres metilaciones y una hidroxilación. Las primeras dos metilaciones son catalizadas por la enzima 6-O-metiltransferasa (6OMT), y la enzima coclaurina N-metiltransferasa (CNMT) (Frenzel y Zenk, 1990), mientras que la enzima N-metilcoclaurina 3' hidroxilasa (NMCH) se encarga de la reacción de hidroxilación (Pauli y Kutchan, 1998). Al final la enzima 3'-hidroxi-N-metilcoclaurina O-metiltransferasa (4OMT), lleva a cabo la última reacción de esta serie (Sato *et al.*, 1994).

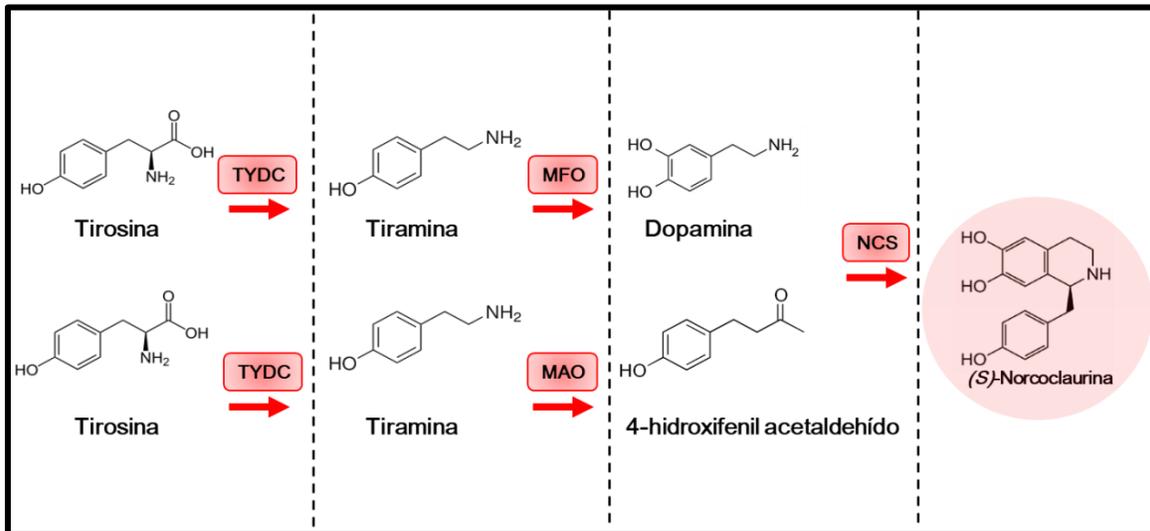


Figura 1.5. Primera etapa de la ruta de biosíntesis de ABIs. La norcoclaurina es formada a partir de la condensación de dos moléculas derivadas a partir de tirosina. Tirosina-decarboxilasa (TYDC), Monofenoloxidasа (MFO), Monoaminoxidasa (MAO), Norcoclaurina sintasa (NCS).

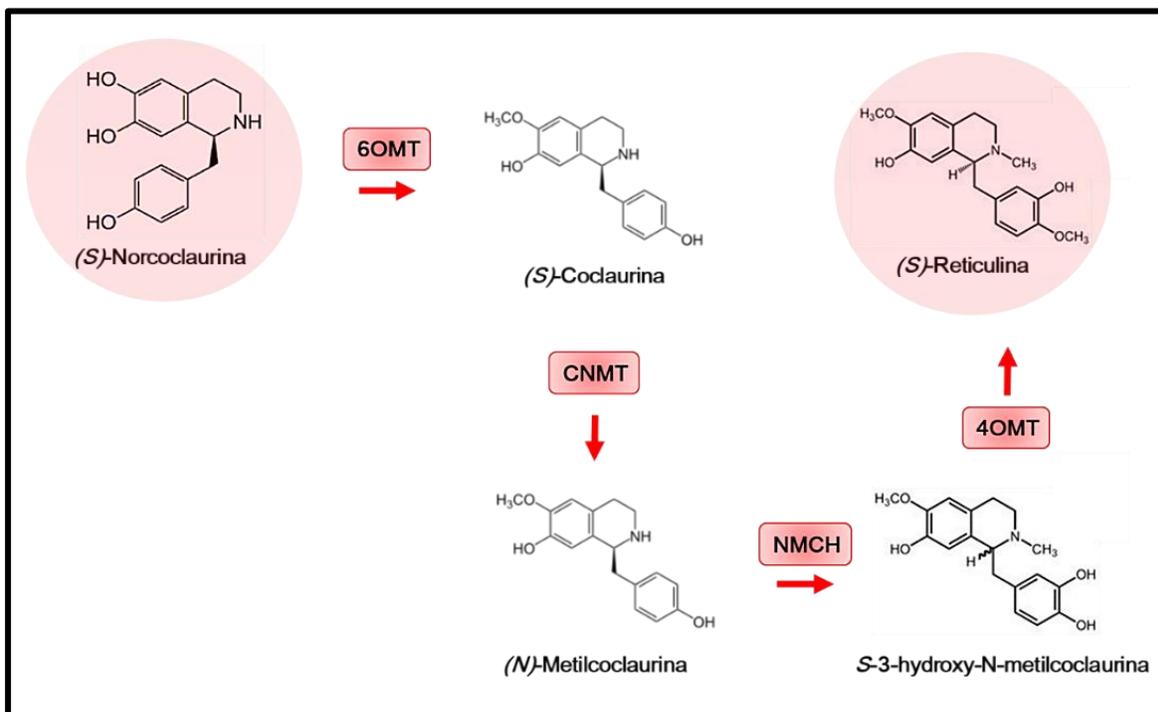


Figura 1.6. Segunda etapa de la biosíntesis de ABIs. La (S)-norcoclaurina se convierte en (S)-reticulina mediante una serie de reacciones que incluyen tres metilaciones y una hidroxilación. 6-O-metiltransferasa (6OMT), coclaurina N-metiltransferasa (CNMT), N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa (NMCH), 3'-hidroxi-N-metilcoclaurina O-metiltransferasa (4OMT).

La (S)-reticulina es el último intermediario común en la síntesis de todos los alcaloides de este tipo (figura 1.6). En la etapa final, la ruta de la biosíntesis se ramifica para producir los tres tipos principales de alcaloides de este grupo y una rama consiste en la formación de los ABIs de tipo benzofenantridina a la cual pertenece la sanguinarina, otra rama se destina para formar alcaloides de tipo protoberberinas ejemplo de ello es la berberina, y otra más para la biosíntesis de los alcaloides morfinanos, donde pertenece la morfina (Pauli y Kutchan, 1998).

En la formación de sanguinarina (figura 1.7), el primer paso implica la conversión del grupo N-metil de la (S)-reticulina en el componente del puente de metileno de la (S)-escoulerina por la enzima puente de berberina (BBE) (liscombe y Facchini 2008). Justo aquí empiezan una serie de reacciones para la síntesis de sanguinarina. La (S)-escoulerina es convertida a (S)-estilopina por la acción de dos enzimas oxidasas: la (S)-chelantiofolina sintasa (CheSyn) y la (S)-estilopina sintasa (StySin). La (S)-estilopina es N-metilada por una enzima llamada tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa (TNMT). Luego la enzima (S)-cis-N-metilestilopina 14-hidroxilasa (MSH) conduce a la formación de protopina. La conversión de la protopina a hidrosanguinarina involucra una hidroxilación, llevada a cabo por la protopina-6-hidroxilasa (P6H). La dihidrosanguinarina se convierte a sanguinarina por la dihidrosanguinarina oxidasa (DBOX). Una sanguinarina reductasa (SanR) que cataliza la conversión de la sanguinarina en dihidrosanguinarina (De-La-Cruz, et al, 2012; Facchini, 2001).

Por su parte, la síntesis de berberina (figura 1.7) inicia con la conversión de la S-escoulerina en S-tetrahidrocolumbamina. Este paso es llevado a cabo por la escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT). Enseguida, la S-tetrahidrocolumbamina se convierte en S-canadina por la canadina sintasa (CAS). Finalmente, la S-canadina se oxida a berberina por acción de la S-tetrahidroberberina oxidasa (STOX) (liscombe y Facchini 2008; De-La-Cruz, et al, 2012; Facchini, 2001), la ruta para la formación de berberina implica menos pasos enzimáticos en comparación con la ruta específica para la sanguinarina.

Cabe mencionar que la sanguinarina y berberina comparten muchos de los intermediarios, lo que puede facilitar la producción de ambos o alcaloides o generar un cambio en la dirección de biosíntesis para cada alcaloide específico durante el desarrollo de las plantas productoras de ABIs.

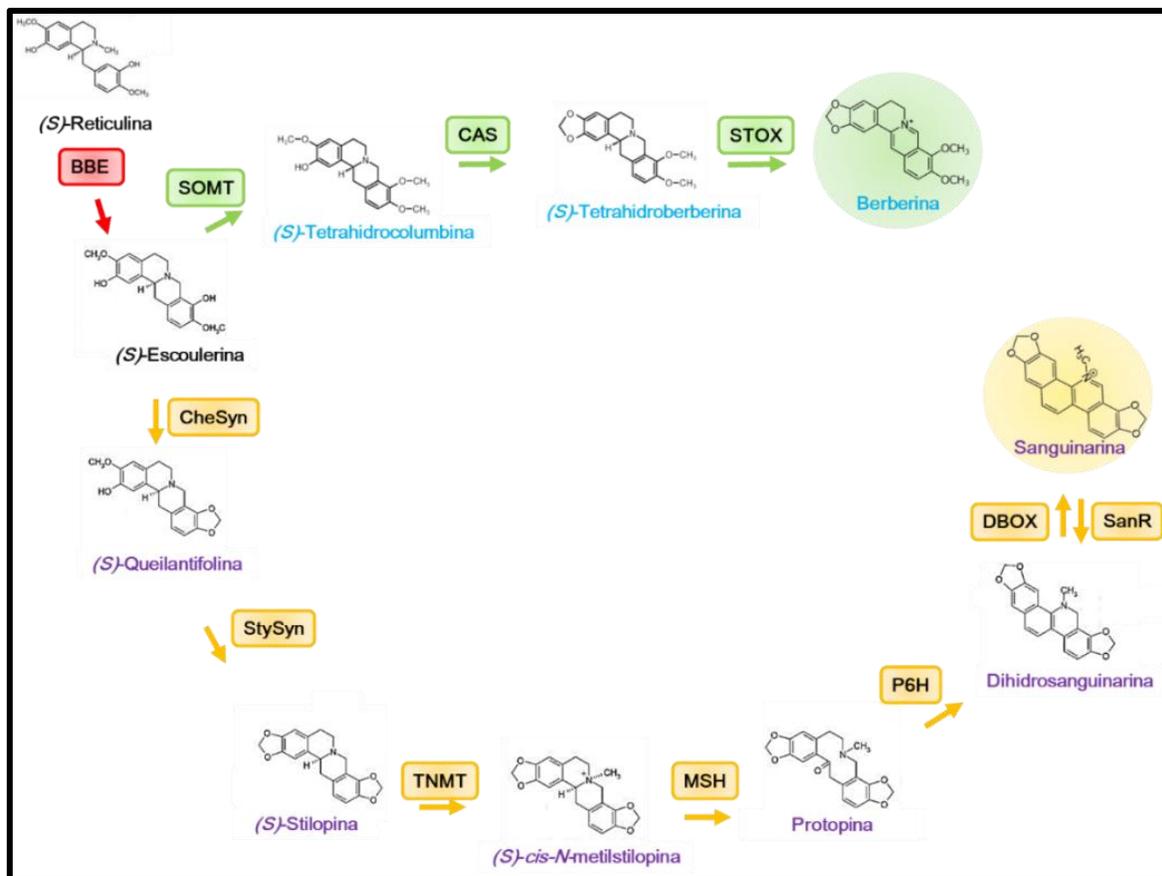


Figura 1.7. Ruta específica para la biosíntesis de berberina y sanguinarina. Enzima puente de berberina (BBE). Para la ruta de sanguinarina: (S)-chelantiofolina sintasa (CheSyn), (S)-estilopina sintasa (StySin), tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa (TNMT), (S)-cis-N-metilestilopina 14-hidroxilasa (MSH), protopina-6-hidroxilasa (P6H), dihidrosanguinarina oxidasa (DBOX), sanguinarina reductasa (SanR). Para la ruta de berberina: escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT), canadina sintasa (CAS), S-tetrahydroberberina oxidasa (STOX).

1.5 Tráfico y acumulación de los ABIs a nivel celular y de tejido específico

La biosíntesis de los ABIs consta de múltiples reacciones enzimáticas. La síntesis de alcaloides en las plantas puede presentar diferentes grados de complejidad ya que puede involucrar la participación distintos tejidos, diferentes tipos celulares en un mismo tejido y diferentes compartimentos en una misma célula. Por ello, su biosíntesis debe de estar altamente regulada. (Facchini, 2001). La localización celular de las vías de biosíntesis de los alcaloides es notablemente diversa y compleja. Los alcaloides en las plantas generalmente se acumulan en determinados tipos de células debido a su citotoxicidad y por respuesta de defensa.

A nivel de compartimiento celular en la amapola (*P. somniferum*; figura 1.8), las enzimas para la biosíntesis del alcaloide sanguinarina se ubican espacialmente distribuidas en el citosol, entre el lumen y la membrana del retículo endoplásmico. Y el almacenamiento ocurre en la vacuola por medio del tráfico de vesículas.

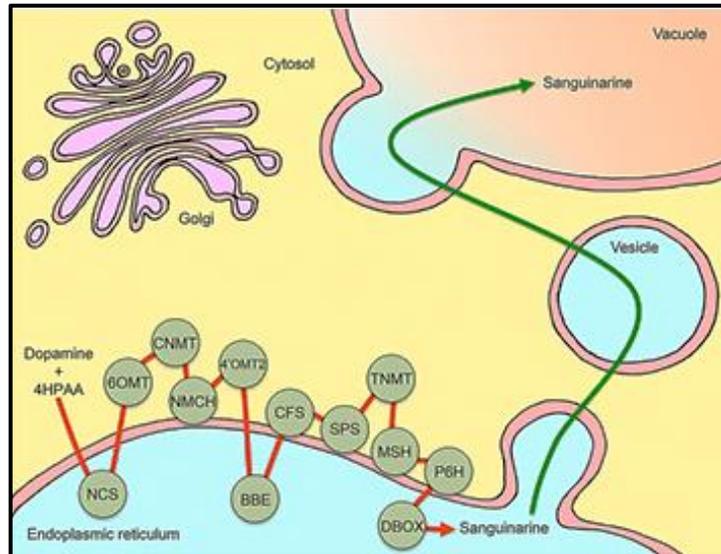


Figura 1.8. Distribución los intermediarios y la localización de las enzimas para la síntesis de sanguinarina en *P. somniferum*. Las flechas roja y verde señalan la ruta intracelular de los intermediarios para la formación de sanguinarina y del propio alcaloide, respectivamente, desde el lumen del retículo endoplásmico a la vacuola central. Tomado de Beadoin y Facchini, 2014.

En cuanto a la biosíntesis y tráfico de los ABIs a nivel interno de tejido, en un principio las células lactíferas (latex) fueron consideradas el sitio de biosíntesis y de acumulación de los ABIs por poseer grandes vesículas donde los alcaloides son almacenados. Estudios posteriores demostraron que la localización celular de las enzimas biosintéticas de ABIs y sus respectivos transcritos involucra otro tipo de células. (Bird et al., 2003; Facchini and De Luca, 1995; Weid et al., 2004). Mediante hibridación *in situ* está demostrado que en *P. somniferum* la biosíntesis y el almacenamiento de ABIs, específicamente implica la participación de tres tipos de células (figura 1.9). El modelo propone que los transcritos involucrados en la biosíntesis de ABIs se expresan en las células acompañantes, posteriormente las enzimas correspondientes se transportan hacia los elementos cribosos del floema para participar en la formación de los alcaloides (figura 1.9). Luego estos alcaloides que fueron sintetizados en los elementos cribosos son transportados hacia las células laticíferas cercanas para el almacenamiento de los alcaloides en grandes vesículas citoplasmáticas (Beadoin y Facchini, 2014).

Anteriormente, los elementos cribosos no eran reconocidos para contribuir en la formación de los ABIs, ya que estos poseen sólo un número limitado de proteínas necesarias para el mantenimiento de las células y el transporte de solutos (Beadoin y Facchini, 2014; Bird et al., 2003; Facchini y De Luca, 1995; Weid et al., 2004).

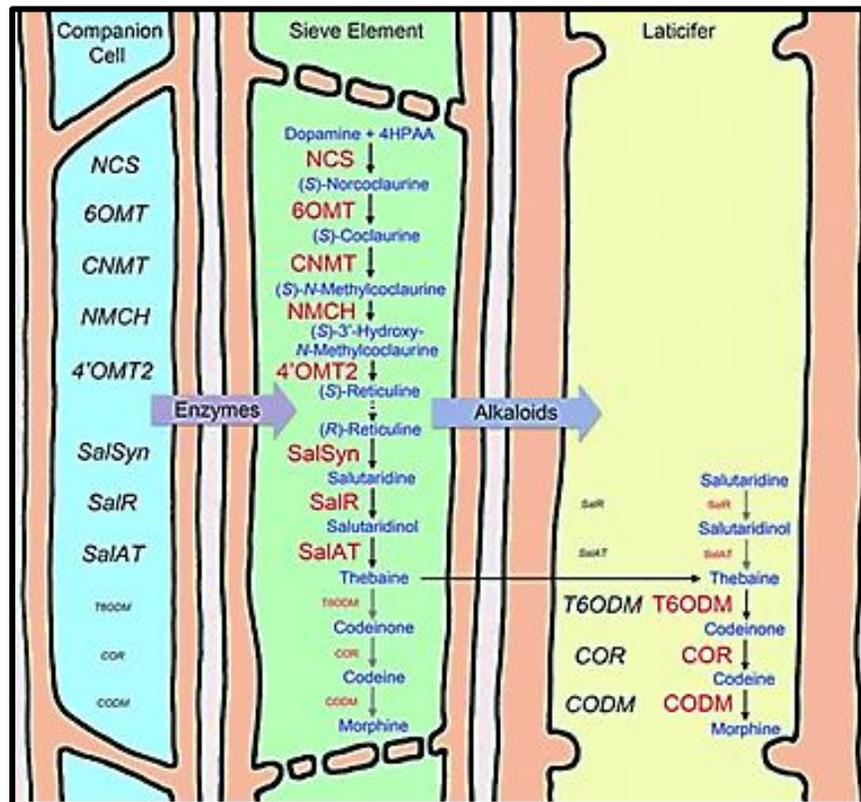


Figura 1.9 Modelo de localización celular que muestra la participación de las células acompañantes, los elementos cribosos y las células laticíferas en la biosíntesis de la morfina en *P. somniferum*. Los genes expresados se muestran en cursivas, mientras que las enzimas se indican en rojo. La flecha horizontal sugiere a la tebaína como el principal intermediario trasladado a las células laticíferas para la culminación de la síntesis de morfina. Tomado de Beadoin y Facchini, 2014.

El tráfico, la acumulación y el origen de la biosíntesis de los ABIs implican la participación de varios tipos de células en un mismo tejido. *Thalictrum flavum* es una especie que produce berberina. La expresión de transcritos de las enzimas correspondientes se ha localizado en raíz, sobre la zona del periciclo, la capa más interna de la corteza, en células corticales adyacentes y por ende en el rizoma (figura 1.10 y figura 1.11) (Samanani et al., 2005). También se han hallado transcritos para ABIS en la corteza del tallo (Liscombe et al., 2009).

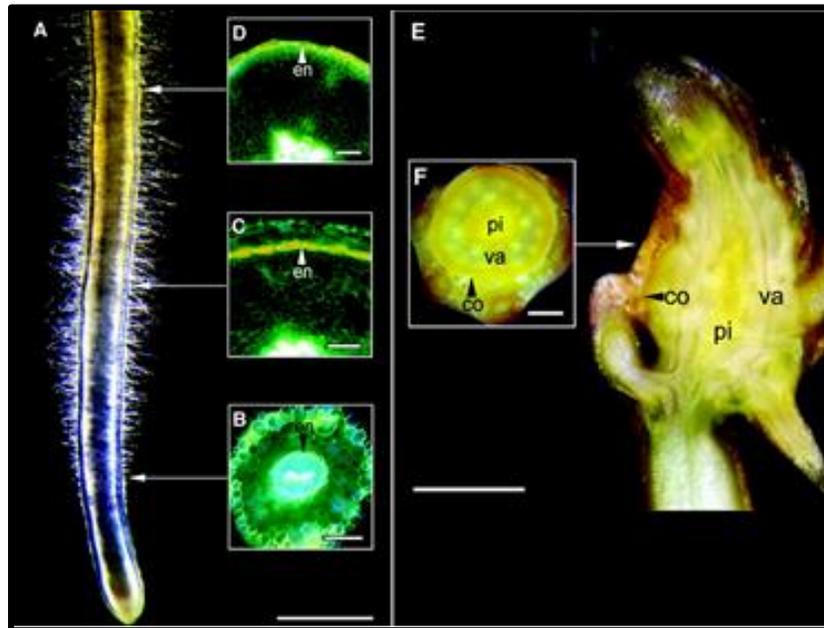


Figura 1.10 Acumulación de berberina en la endodermis de raíces de *T. flavum*. La berberina se encuentran en la médula y la corteza de los rizomas de *T. flavum*. Se muestra la acumulación de alcaloides protoberberina en la raíz entera fresca (A). Secciones transversales de 0.5 mm de raíces frescas en diversas etapas de desarrollo es mostrado mediante microscopía óptica (A) y revelado por microscopía de epifluorescencia (B, C y D). Acumulación de alcaloides en secciones longitudinales y secciones transversales del rizoma (E y F). Tomado de Samanani et al., 2005.

La distribución de intracelular de las enzimas involucradas en la síntesis de otros alcaloides también se conoce. Por ejemplo, las enzimas que catalizan el primer y último paso en la biosíntesis del alcaloide tropánico, escopolamina, se localizan en el periciclo de la raíz de *Atropa belladonna* y de *Hyoscyamus muticus* (figura 1. 11 a) (Hashimoto et al., 1991; Suzuki et al., 1999). En *C. roseus* los alcaloides son secuestrados en los idioblastos, la epidermis y en células laticíferas (figura 1.11 b) (St-Pierre et al., 1999). En las especies de *Senecio*, los alcaloides de pirrolizidina se producen en raíces. La biosíntesis de los alcaloides de pirrolizidina y se localiza en la endodermis de la raíz y la corteza adyacente al floema, lo que podría reflejar un alojamiento funcional para el transporte sistémico de alcaloides hacia el tallo (figura 1.11 c). Las inflorescencias son los principales sitios de acumulación de alcaloides de pirrolizidina *Senecio vernalis* (Hartman y Dierich, 1998). En *Eupatorium cannabinum* las enzimas involucradas en la síntesis de alcaloides se encuentran a lo largo de la corteza radicular (figura 1. 11 d). En *P. somniferum* la transcripción y traducción de los genes biosintéticos se producen en las

células acompañantes (Bird et al., 2003; Facchini y De Luca, 1995; Weid et al., 2004) seguidas por el transporte de enzimas funcionales a los elementos cribosos, que sirven como el sitio de la biosíntesis de alcaloides y posteriormente estos alcaloides se transportan a las células laticíferas para su almacenamiento en grandes vesículas de látex (Bird et al., 2003).

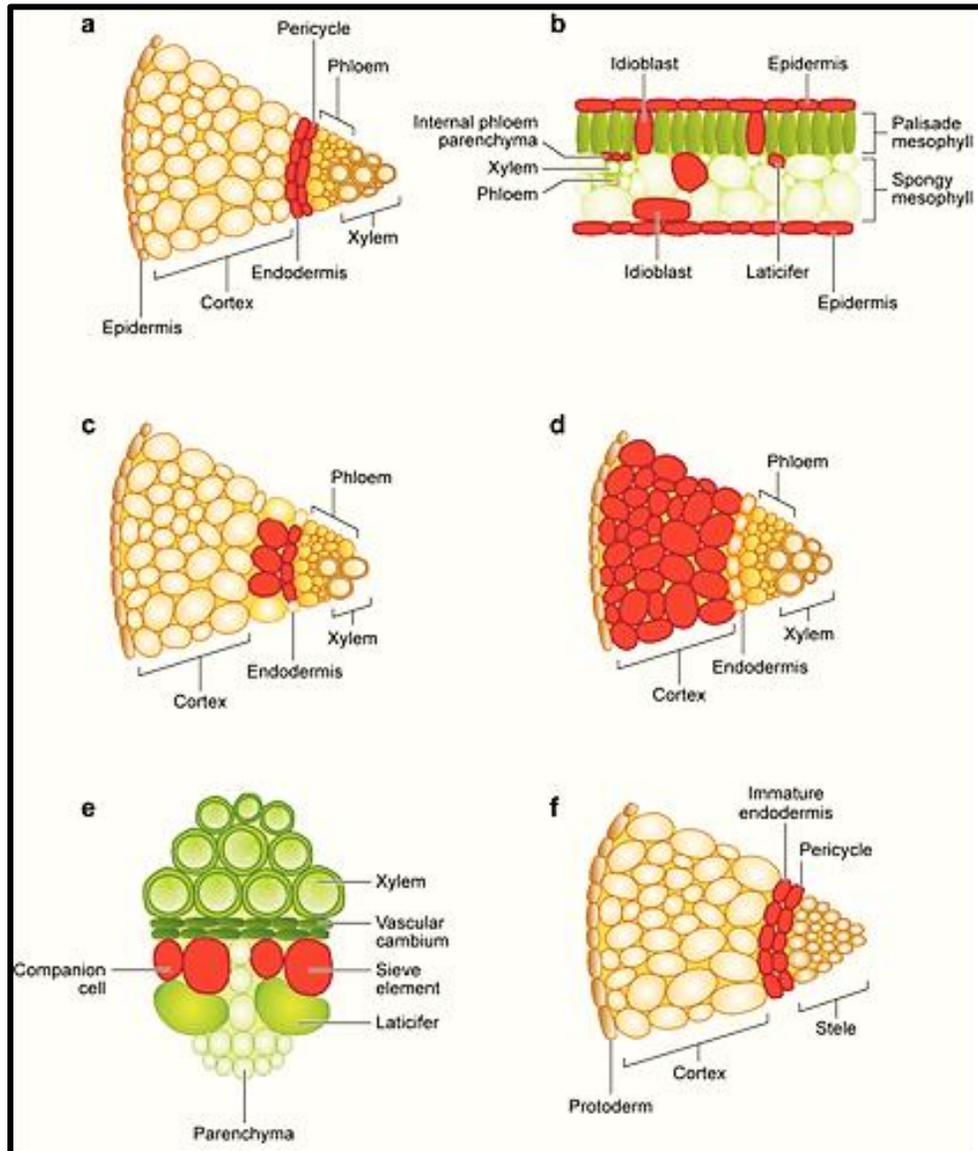


Figura 1.11 La localización específica de las enzimas participantes y / o los transcritos para la biosíntesis de alcaloides en tejidos de diversas especies. Se muestran en rojo la región de biosíntesis de tropanos en (a) raíces de *A. belladonna* y raíces de *H. niger*, (b) alcaloides indol terpenoides en hojas de *C. roseus*, (c) alcaloides de pirrolizidina en raíces de *S. vernalis*. (d) en raíces de *E. cannabinum*. (e) ABIs en haces vasculares de *P. somniferum*, (f) y en raíces de *T. flavum*. Tomado de Ziegler y Facchini, 2008.

1.6 La acumulación de alcaloides en tejidos específicos de algunas especies.

La acumulación de alcaloides en tejidos específicos es variada (figura 1.12). En *P. somniferum* la sanguinarina se encuentra sólo en la raíz, mientras que la papaverina y la noscapina se han detectado solamente en los órganos aéreos. En contraste, la morfina y la codeína predominan en las partes aéreas, aunque también se pueden encontrar en bajas cantidades en la raíz (Huang and Kutchan, 2000). En hojas y frutos de *Macleaya microcarpa* los alcaloides abundantes son alocriptopina, protopina y la sanguinarina, a su vez la sanguinarina es posible hallarla en raíz junto con los alcaloides queletrina y protropina. La capacidad de *A. mexicana* para acumular sanguinarina (benzofenatridina) en dos tejidos diferentes (raíz y semilla madura) y berberina (protoberberina) en toda la planta, difiere de lo reportado en *P. somniferum* y *E. californica* (Papaveraceas) que sólo acumulan sanguinarina en la raíz y no sintetizan berberina. En este sentido, también difiere de *T. flavum* (Ranunculacea) la cual es capaz de acumular berberina en toda la planta y no produce sanguinarina (Facchini, 2001; Ziegler y Facchini, 2008). Más aún, pocas son las plantas que combinan la presencia de alcaloides de estos dos grupos (Waterman, 1998). Por su parte, los alcaloides vinblastina, y vincristina están presentes en hojas y frutos de *C. roseus*, mientras que la catarantina se distribuye por toda la planta.

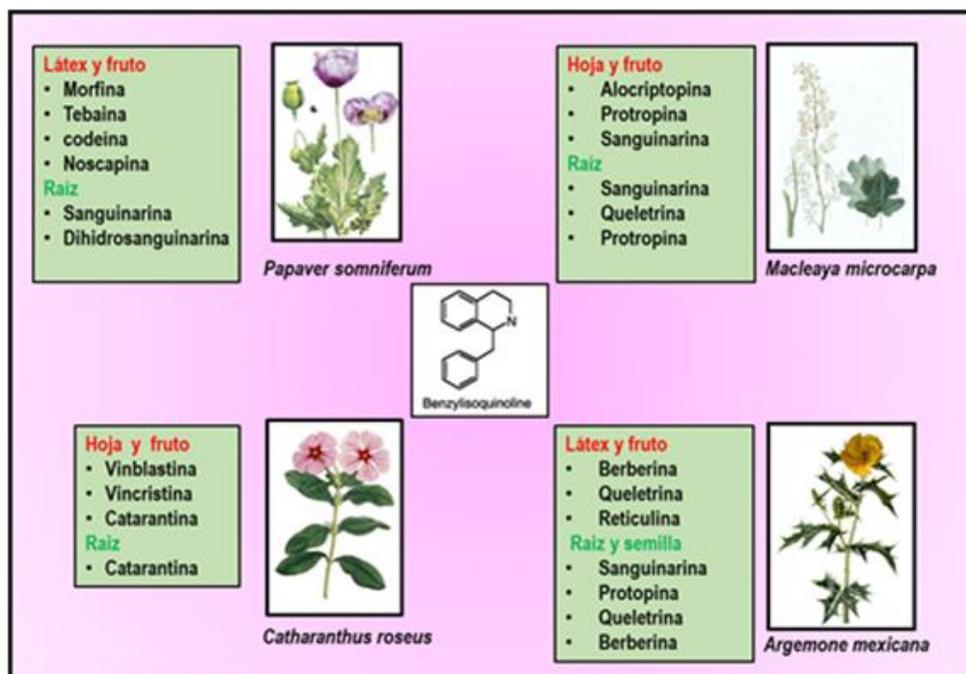


Figura 1.12. La acumulación de alcaloides en tejidos específicos. Mostramos la distribución espacial de los alcaloides de la familia papaveraceas, como *P. somniferum*, *Macleaya microcarpa*, *Argemone mexicana*; y de la familia Apocynaceae, *Catharanthus roseus*.

1.7 Distribución de los alcaloides en *A. mexicana* y su relación con la actividad transcripcional.

Como anteriormente se ha mencionado, *A. mexicana* produce los alcaloides berberina y sanguinarina. La sanguinarina es acumulada en raíces y en semillas de estado maduro. La berberina está presente en todos los tejidos. El botón floral y la raíz son tejidos que acumulan abundante berberina, esto hace contraste con las bajas cantidades halladas semillas inmaduras. Las cantidades más altas de sanguinarina se encontraron en semillas maduras (Rubio-Piña, 2009)

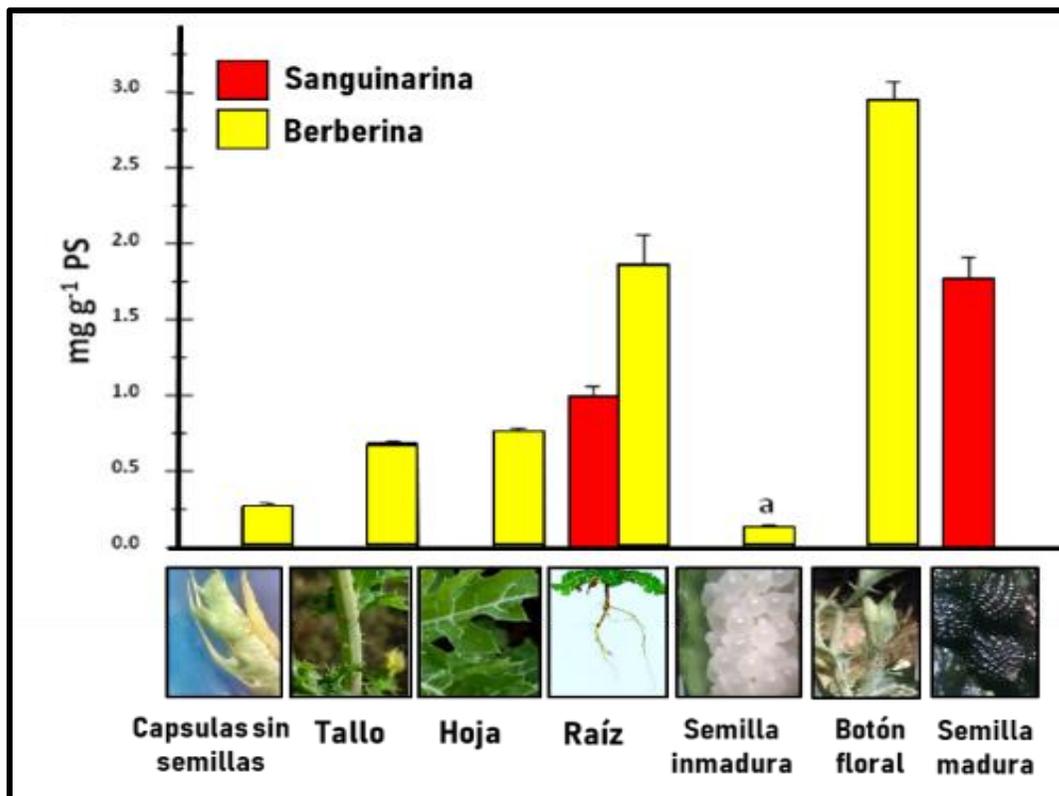


Figura 1. 13. Abundancia de sanguinarina y berberina en tejidos de *A. mexicana*. Modificado de Rubio-Piña 2009.

Los sitios de acumulación de alcaloides difieren de aquellos que muestran una actividad transcripcional relacionada con su síntesis (figura 1.14). Se analizaron los transcritos correspondientes a genes seleccionados involucrados tanto en las reacciones biosintéticas iniciales, que son comunes para ambos alcaloides (*TyDC*, *NCS1*, *NCS2*, *BBE1* y *BBE2*), así como en las reacciones específicas finales para berberina (*SOMT* y *STOX*) y para sanguinarina (*CheSyn* y *DBO*). Las raíces fueron los sitios de mayor acumulación de alcaloides a pesar de que mostraron la menor acumulación de los

transcritos analizados. En tallos se encontró la mayor abundancia de transcritos para todos los alcaloides, sin embargo, este tejido no tiene preferencia en acumular sanguinarina ni queletrina pero si de berberina. Estos resultados se discuten en función de la operación de un posible mecanismo de transporte de alcaloides entre los tejidos (Xool-Tamayo et al., 2017; Vázquez-Flota et al, 2018).

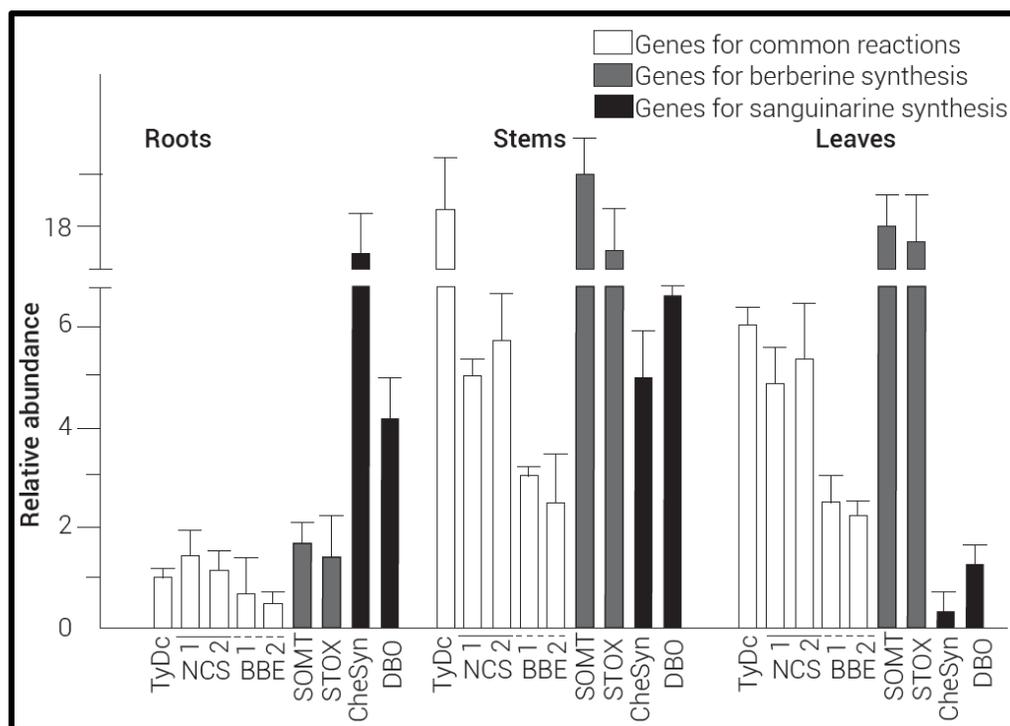


Figura 1.14. Distribución y abundancia relativa de transcritos biosintéticos de alcaloides en tejidos de *A. mexicana*. Tomado de Vázquez-Flota 2018.

1.8 Síntesis de alcaloides durante el desarrollo de frutos

Durante el proceso de desarrollo del fruto se ha documentado el cambio en los contenidos de metabolitos que acumula. En cuanto a los alcaloides, se han reportado diversos trabajos sobre los contenidos variados en distintas etapas de desarrollo de frutos de diversas especies. En frutos de *Datura stramonium*, se midieron los contenidos de atropina y escopolamina, (alcaloides pertenecientes al grupo de los tropánicos) en semillas y pericarpios en estado inmaduro y maduro (figura 1.15). Los resultados muestran que la escopolamina sólo se acumula en las semillas (0.012 ng en estado inmaduro y 0.089 ng en estado maduro). Por su parte, la atropina se puede encontrar en ambos tejidos, siendo el pericarpio el tejido con mayor acumulación (0.170 ng en estado inmaduro y 0.387 ng en estado maduro) (Miraldi et al., 2001).

Samples	Young plants		Adult plants	
	Atropine	Scopolamine	Atropine	Scopolamine
Small leaves ^b	0.156 ± 0.008	0.073 ± 0.001	0.165 ± 0.006	0.016 ± 0.007
Medium leaves ^c	0.831 ± 0.014	0.047 ± 0.005	0.150 ± 0.002	0.022 ± 0.005
Big leaves ^d	0.228 ± 0.004	0.035 ± 0.009	0.134 ± 0.004	0.044 ± 0.006
Stems	0.915 ± 0.015	0.129 ± 0.014	0.001 ± 0.001	–
Roots	0.121 ± 0.015	0.014 ± 0.004	–	–
Flowers	Flower buds		Open flowers	
	0.299 ± 0.021	0.106 ± 0.031	0.270 ± 0.026	0.066 ± 0.004
Fruits	Immature fruits		Mature fruits	
Pericarp	0.001 ± 0.001	–	0.001 ± 0.001	–
Seeds	0.170 ± 0.003	0.012 ± 0.001	0.387 ± 0.015	0.089 ± 0.010

^a Values are mean ± S.D. (*n* = 6); –, absent.
^b Young, 1–5 cm; adult, 3–7 cm.
^c Young, 5–9 cm; adult, 8–13 cm.
^d Young, 9–11 cm; adult, 14–25 cm.



Figura 1.15. Medición de los alcaloides escopolamina y atropina durante el desarrollo de frutos y semillas de *D. stramonium*. Flores y capsulas en estado inmaduro (derecha superior). Capsula en estado maduro (derecha inferior) Modificado de Miraldi et al, 2001.

Srimany y colaboradores (2016), analizaron la presencia de los alcaloides arecolina, arecaidina y guvacina en los frutos de areca (*Areca catechu*) (figura 1.16). En estado inmaduros estos tres alcaloides se distribuyen por todo el fruto. Cuando el fruto se encuentra en estado maduro, el pericarpio deja de acumular estos tres alcaloides manteniendo sólo cantidades mínimas de guvacina, mientras que la semilla aun presenta abundancia de estos tres alcaloides.

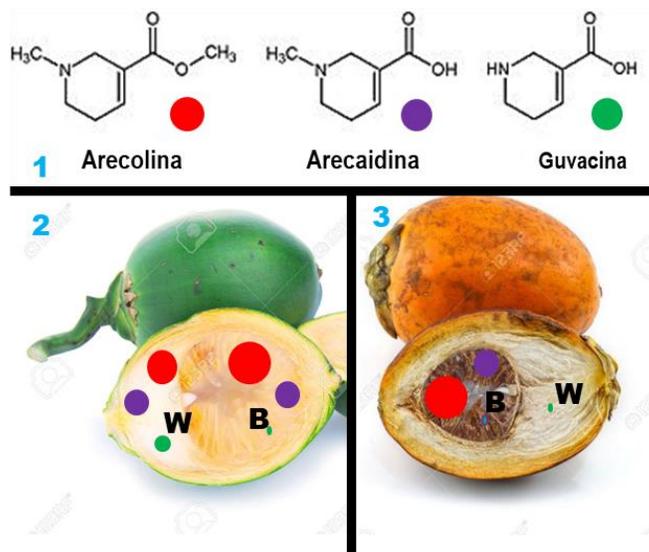


Figura 1.16. Distribución de alcaloides durante el desarrollo de *A. catechu*. Estructuras químicas de arecolina arecaidina y guvacina (1). Fruto en estado inmaduro (2). Fruto en estado maduro (3). Región blanca (W) representa el pericarpio. Región oscura (B) representa la semilla. El tamaño de los círculos hace referencia a la abundancia de alcaloides. Adaptado de Srimany, 2016.

En otro estudio se analizaron los cambios en los contenidos de cafeína de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, así como su relación con la presencia de genes involucrados en la biosíntesis de este alcaloide (figura 1.17) (Koshiro et al, 2006). En ambas especies, los resultados demuestran que cuando la semilla empieza a madurar (etapa E de la figura 1.17), este tejido acumula cantidades mucho mayores en comparación al pericarpio. En este mismo trabajo se realizaron los análisis moleculares en frutos completos, y se analizaron la presencia de los genes 7-metilxantosina sintasa (*CmXRS1*), café teobromina sintasa (*CTS2*) y café cafeína sintasa (*CCS1*), tres genes que codifican N-metiltransferasas para la biosíntesis de cafeína y un gen más correspondiente a la metionina sintasa (*MS*). Los resultados señalan que en *C. arabica*, los transcritos están presentes durante el desarrollo del fruto y que únicamente disminuyen sólo en la etapa de la dehiscencia (etapa G de la figura 1.17). En *C. canephora*, los transcritos no están presentes únicamente en la primera etapa de desarrollo (etapa A de la figura 1.17). En ambas especies sólo el gen *CTS2* muestra una expresión casi nula en todos los estadios (figura 1.17), (Koshiro et al, 2006).

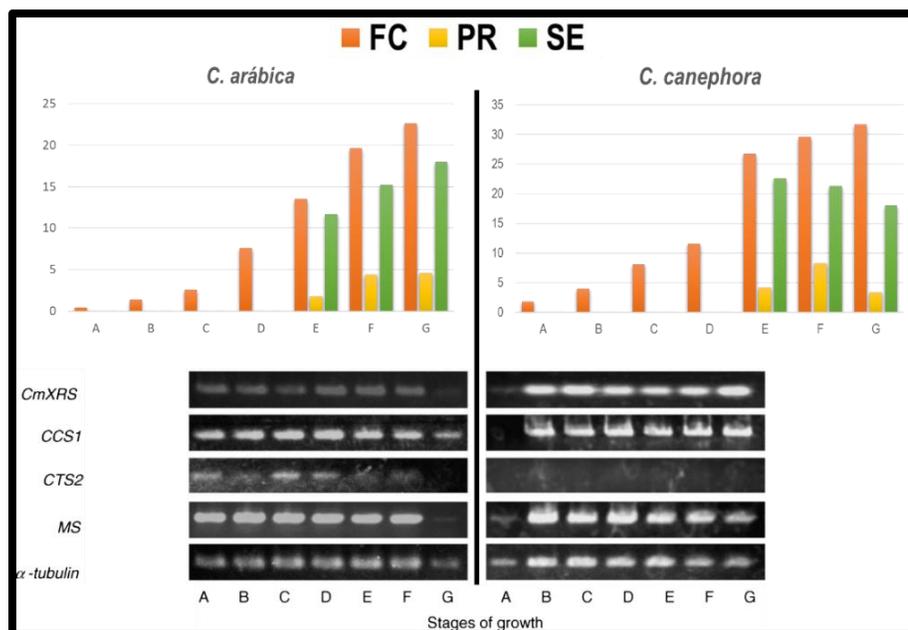


Figura 1.17 Contenidos de cafeína y actividad transcripcional durante el desarrollo del fruto de las especies *C. arabica* y *C. canephora*. Las cantidades de alcaloides fueron medidas en fruto completo (FC), pericarpio (PR) y semilla (SE). En la parte inferior se muestra el análisis molecular realizado sólo con frutos completos. 7-metilxantosina sintasa (*CmXRS1*), café teobromina sintasa (*CTS2*), café cafeína sintasa (*CCS1*), tres genes que codifican N-metiltransferasas para la biosíntesis de cafeína y la metionina sintasa (*MS*). Modificado de Koshiro et al, 2006.

Los contenidos de berberina fueron analizados durante el desarrollo del fruto en tres especies de *Berberis* (*Berberis lycium*, *Berberis chitria* y *Berberis vulgaris*) (figura 1.18). En las tres especies, las cantidades más altas de berberina se presentaron cuando los frutos lograban la maduración completa. El tiempo para alcanzar la maduración completa de los frutos fue variado entre las especies. 45 días para *B. lycium*, 30 días para *B. chitria* y 60 días para *B. vulgaris*. De las tres especies *B. lycium* presentó la mayor acumulación de berberina con 15 mg/g de peso seco. Mientras que en *B. chitria* las cantidades de berberina fueron de 13 mg/g de peso seco. En *B. vulgaris* los valores de berberina fueron 11 mg/g de peso seco (Chandra y Todaria, 1983).

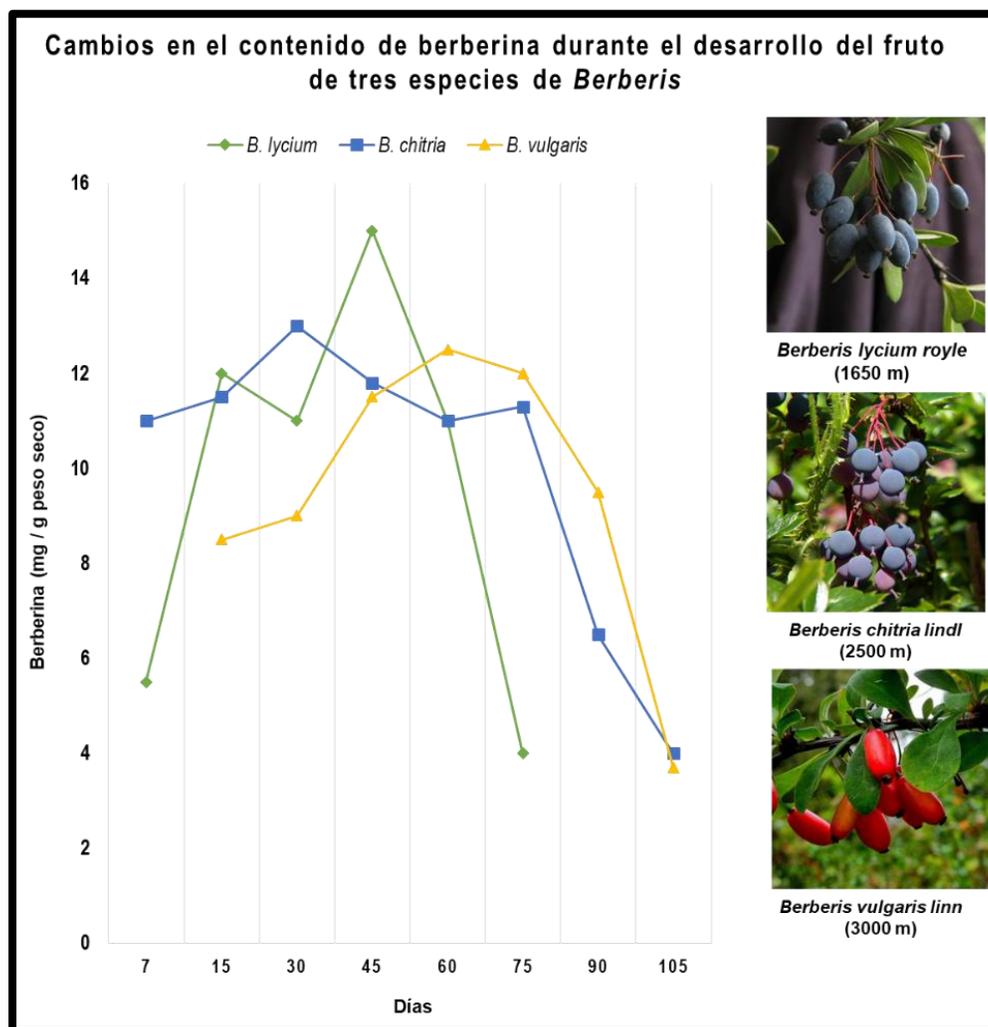


Figura 1.18. Contenidos de berberina en el desarrollo del fruto en tres especies de *Berberis*. Las más altas cantidades de berberina se presentaron cuando los frutos lograban la maduración completa. Altura de los cultivares entre paréntesis. Modificado de Chandra y Todaria, 1983.

En plantas silvestres de *Sanguinarine canadensis* se analizaron las cantidades de sanguinarina durante el desarrollo en etapas de latencia, latencia tardía, antesis y fructificación (figura 1.19). De todos los tejidos, las cantidades más altas de sanguinarina se presentan en la raíz, alcanzando su máxima producción en la etapa de antesis. Por su parte el fruto, pareciera no ser un tejido productor de sanguinarina por sus mínimas contenidas detectadas; no obstante, el fruto en la etapa inmadura presentó la mayor cantidad de sanguinarina en comparación a la cantidad detectada en el fruto maduro (Campbell et al, 2007).

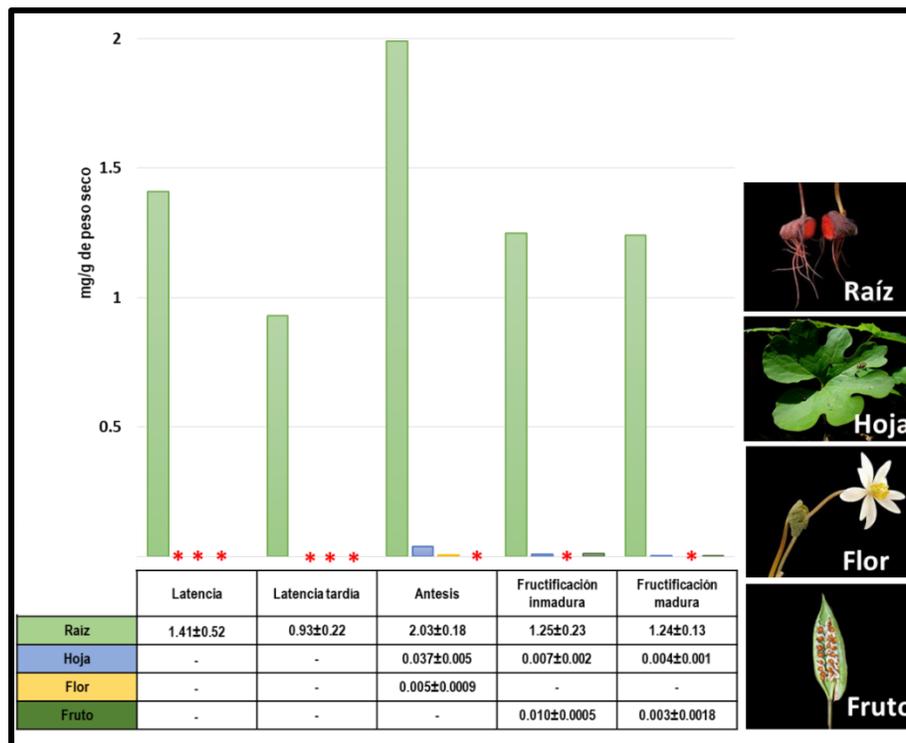


Figura 1.19. Contenido de sanguinarina en etapas de desarrollo de *S. canadensis*. Los tejidos (raíz, hoja, flor y fruto) fueron analizados en etapas de latencia, latencia tardía, antesis, fructificación inmadura y fructificación madura. *: Tejido no presente en la etapa de desarrollo. Modificado de Campbell et al, 2007

1.9 Alcaloides en frutos de papaveráceas.

P. sumnuferum es distintivo en su producción de valiosos alcaloides que incluyen tebaína, codeína y morfina, que son los principales componentes de su látex y la sanguinarina que se acumula en raíz. La fruta capsular es un tejido productor de alcaloides. En la base de la cápsula, los haces vasculares se fusionan formando varios haces anficribrales (Kapoor, 1973; Fukuda, 2004).

La organización y concentración del tejido vascular junto con las células laticíferas asociadas contribuyen a la producción competente de látex en la fruta. Las semillas en realidad están libres de alcaloides ya que los vasos lactíferos terminan en la placenta y no llegan al óvulo en desarrollo (Bernáth, 1998).

De manera particular, se conoce que las capsulas de los frutos y las semillas inmaduras de *A. mexicana* son tejidos productores de berberina, mientras que las semillas maduras son productoras de sanguinarina. Se desconoce el origen de la sanguinarina presente en las semillas maduras, y además no ha realizado el estudio detallado sobre el análisis de alcaloides durante el desarrollo del fruto y semillas de *A. mexicana*.

1.10 Anatomía del fruto de *A. mexicana*.

El fruto de *A. mexicana* es una cápsula poricidal, que se apoya sobre un receptáculo y un pedúnculo (Fig. 3.1 A). En la parte superior presenta un estigma plano compuesto de rayos estigmáticos con pliegues fusionados en los bordes y separados por invaginaciones profundas. La cantidad de rayos estigmáticos, entre 4 y 6, es igual a la cantidad de carpelos (Fig. 3.1 B y C) (Kourmpetli y Drea 2014).

Los carpelos están ordenados en forma de valva y sus bordes se fusionan dentro del septum introlocular (Fig. 3.1 D y F). El septum está posicionado de manera adaxial y no se extiende al centro del fruto produciendo una capsula unilocular (lóculos incompletos) (Fig. 3.1 C y F). En la superficie interior del septum se encuentran las semillas, sostenidas por la placenta (Fig. 3.1 D y E, flecha negra) que sostienen a las semillas, y en el interior del septum se halla el conducto vascular (Figura 3.1 F, flecha roja) (Grey-Wilson, 2000). Dada este tipo de distribución, las porciones del fruto, colectados como “septum intralocular”, incluían, además de este tejido, los rayos estigmáticos, así como porciones de las valvas.

En la base de la cápsula, los haces vasculares se fusionan. Esta organización, junto con la concentración del tejido vascular y las células laticíferas asociadas contribuyen a la producción de látex en el fruto (Kapoor, 1973; Fukuda, 2004). Las semillas de *A. mexicana* presentan alcaloides desde etapas tempranas de desarrollo, lo cual difiere de las de *P. somniferum*, que están libres de alcaloides debido a que los vasos lactíferos terminan en la placenta y no llegan al óvulo en desarrollo (Kourmpetli y Drea, 2014).

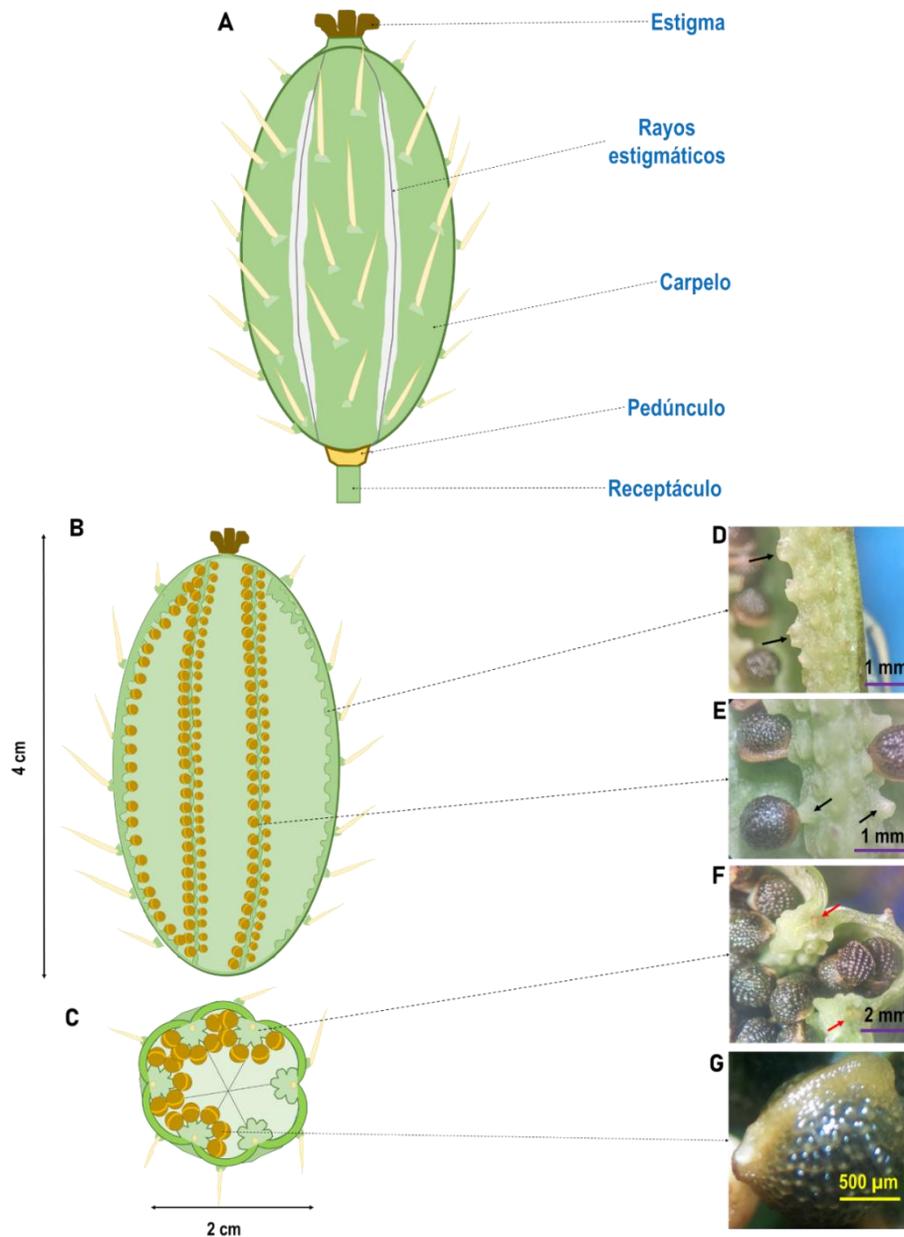


Figura 1.20 Anatomía del fruto de *A. mexicana*. (A) Ilustración de la vista externa de una cápsula de *A. mexicana*, mostrando el receptáculo sobre el que se sostiene y el pedúnculo que corresponde a la porción terminal del tallo. En la parte superior presenta un estigma plano compuesto de rayos estigmáticos. (B) Ilustración de un corte longitudinal del interior de la cápsula. (C) Ilustración de la vista transversal. (D) Borde del carpelo y su fusión en el septum. (E) Vista frontal del septum intralocular. (F) Ordenamiento de los carpelos (en forma de valvas) y la posición adaxial del septum que no se extiende al centro del fruto. (G) Semilla madura. Las flechas negras (→) en D, E y F señalan las válvulas que sostienen las semillas, mientras que las flechas rojas (→) en F señalan los haces vasculares.

Por su parte, la semilla funciona como unidad reproductiva y vincula las generaciones sucesivas. Las semillas de *A. mexicana* no son alargadas, tienen un diámetro de cerca de 1 mm de largo y una tonalidad oscura. En la figura 3.4 se muestra un corte longitudinal de la semilla de *A. mexicana* mostrando los principales componentes: embrión, endospermo y la presencia de la cubierta que es especialmente importante para una interpretación correlativa de una semilla en estado maduro (Boesewinkel y Bouman, 1984). En semillas maduras de *A. mexicana* y de *Argemone aurantica* la testa se compone de tres capas de células recubierta por una gruesa cutícula. La región donde se liga la semilla y el septum es nombrada como funículo (Fig. 3.4 B) (Soman y Bhargava, 1980). Las características externas de esta semilla subsférica son el pico micropilar, el rafe surcado y el umbo chalazal (Soman y Bhargava, 1980). El hilum cráter se coloca entre el pico y el rafe (Fig. 3.4 C). A medida que la semilla se desarrolla, la testa se torna oscura (Fig. 3.4 D). En frutos dehiscentes, las paredes externas de la testa de la semilla se secan y se vuelven en cóncavas, dando a la superficie de la semilla la apariencia de depresiones reticuladas (Fig. 3.4 F) (Cresson y Schneider 1988).

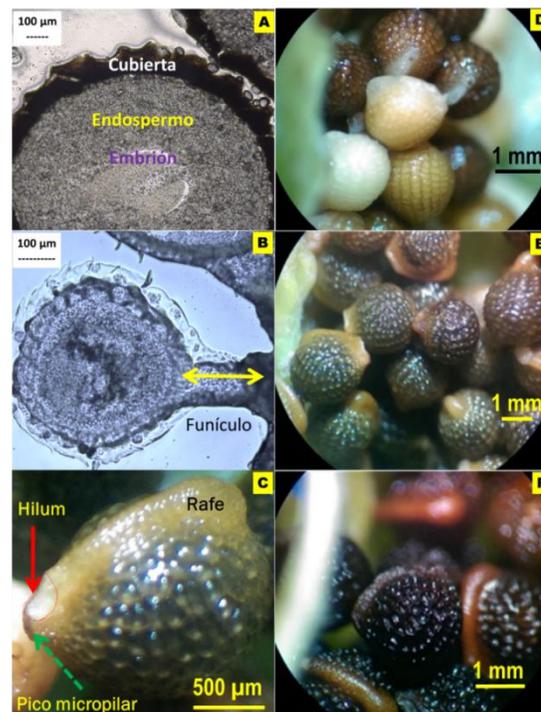


Figura 1.21. Morfología de la semilla de *A. mexicana*. (A) Se muestra los principales componentes internos de la semilla como la cubierta, el endospermo y el embrión. (B) Muestra el funículo que conecta a la semilla con el septum intralocular. (C) Muestra los componentes externos, el pico micropilar, el hilum y el rafe. (D) A medida que la semilla se desarrolla, la cubierta

de esta se empieza a oscurecer (D), hasta alcanzar la madurez (E). En frutos dehiscentes, las paredes externas de la testa de la semilla se secan y se vuelven cóncavas, dando a la superficie de la semilla la apariencia de depresiones reticuladas (F). Figura A y B proporcionado por el M. en C. Jorge Alfredo Loyd Loza Müller y por la M. en C. Ángela Francisca Kú González.

1.11 Recapitulación de los antecedentes

La importancia de *A. mexicana* (Papaveraceae), comúnmente nombrada como cardosanto, surge por su uso medicinal, ya que a lo largo de la historia diversas culturas lo empleaban para el tratamiento de nubes o cataratas para aliviar la fiebre, la sarna, como purgante y en ciertas enfermedades cutáneas, todas dependiendo del tejido empleado (Lozoya, X. 1999). La presencia de alcaloides en diferentes partes de la planta puede explicar las propiedades medicinales. Hoy en día a estos metabolitos se han empleado para terapias anticancerígenas, para actividad antimicrobiana, entre otras (Chang, Y., et al, 2003).

Los alcaloides presentes en *A. mexicana* son del grupo de los bencilisoquinolínicos (ABIs), derivados de la tirosina. En *A. mexicana* los alcaloides mayoritarios son la berberina (protoberberina) y la sanguinarina (benzofenatridina). La berberina está distribuida en todos los tejidos e inclusive en semillas de estado inmaduro. La sanguinarina tiene presencia en raíz y en semillas maduras (Rubio-Piña, 2009; Lozoya y Lozoya, 1982). La berberina exhibe una potente actividad contra insectos (Shields y col. 2008). Por su parte la sanguinarina se emplea para la generación de tratamientos quimioterapéuticos y promotores del sistema inmune contra los carcinomas (Rubio-Piña y Vazquez-Flota; 2013). Con relación a sus propiedades antimicrobianas, se sugiere que la función de los ABIs en las plantas es la de protección contra herbívoros y agentes patógenos. (Schmeller et al., 1997; García et al., 2006M; Osho y Adetunji, 2010). Muchas plantas, tal es el caso de las Papaveraceas, invierten considerables recursos para la producción de estos alcaloides, por lo que sugiere que estos componentes juegan un papel relevante en la fisiología y desarrollo de la planta (Schmeller et al., 1997; Wink et al., 1998).

El inicio de la ruta de biosíntesis de los ABIs (figura 1.5) implica la condensación de dos moléculas derivadas de la tirosina, seguido de múltiples reacciones hasta la formación de (S)-norcoclaurina, donde se encuentra comprometida la primera etapa de la vía de biosíntesis. En la siguiente fase de la ruta biosintética (figura 1.6), la (S)-norcoclaurina se convierte en (S)-reticulina mediante una serie de reacciones que incluyen tres

metilaciones y una hidroxilación (Pauli y Kutchan, 1998). La (S)-reticulina es el último intermediario común en la síntesis de todos los alcaloides de este tipo (figura 1.6). En la etapa final, la ruta de la biosíntesis se ramifica para producir los tres tipos principales de alcaloides de este grupo y una rama consiste en la formación de los ABIs de tipo benzofenantridina, otra rama para formar alcaloides de tipo protoberberinas, y otra más para la biosíntesis de los alcaloides morfinanos (Pauli y Kutchan, 1998). En base a esto, es necesario resaltar que los alcaloides mayoritarios de *A. mexicana*, berberina y sanguinarina, comparten intermediarios comunes facilitando la formación de estos metabolitos en determinados momentos de desarrollo.

Como ya se ha descrito anteriormente, la biosíntesis de los ABIs consta de múltiples reacciones enzimáticas. La síntesis de alcaloides en las plantas puede presentar diferentes grados de complejidad ya que puede involucrar la participación de distintos tejidos, diferentes tipos celulares en un mismo tejido y diferentes compartimentos en una misma célula. Por ello, la biosíntesis de los ABIs debe de estar altamente regulada (Facchini, 2001).

En *A. mexicana*, los sitios de acumulación de alcaloides difieren de aquellos que muestran una actividad transcripcional relacionada con su síntesis (figura 1.14). Vázquez-Flota y colaboradores (2018) analizaron los transcritos correspondientes a genes seleccionados involucrados tanto en las reacciones biosintéticas iniciales que son comunes para ambos alcaloides (*TyDC*, *NCS1*, *NCS2*, *BBE1* y *BBE2*), así como en las reacciones específicas finales para berberina (*SOMT* y *STOX*) y para sanguinarina (*CheSyn* y *DBO*). Las raíces fueron los sitios de mayor acumulación de alcaloides a pesar de que mostraron la menor acumulación de los transcritos analizados. En tallos se encontró la mayor abundancia de transcritos para ambos alcaloides, sin embargo, este tejido no acumula sanguinarina. Estos resultados se discuten en función de la operación de un posible mecanismo de transporte de alcaloides entre los tejidos (Xool-Tamayo et al., 2017; Vázquez-Flota et al., 2018).

Planteamiento del problema

Se desconoce el origen de la sanguinarina presente en las semillas maduras. El posible origen de este alcaloide podría llevarse a cabo de manera *in situ*, ya que no se ha detectado sanguinarina en el tallo ni en el látex de la planta, pudiendo ser el medio por el cual la sanguinarina pudiese traficar partiendo de la raíz movilizándose mediante los tejidos vasculares hasta acumularse en la semilla (Carrillo-Pech, 2006; Frick et al., 2005). Si no fuese así, otra posibilidad se puede fundamentar en que otro tejido esté involucrado en la formación de la sanguinarina en semillas. Este tejido podría ser el fruto ya que también es un tejido capaz de producir alcaloides, principalmente berberina. Considerando que la biosíntesis de sanguinarina y berberina comparten intermediarios tempranos comunes (figura 1.6 y figura 1.7) es posible que en algún momento del desarrollo dichos intermediarios puedan dirigirse en la biosíntesis de sanguinarina.

JUSTIFICACIÓN.

En plantas adultas de *A. mexicana* la berberina, es predominante en raíz y en las partes aéreas, incluyendo frutos y semillas en estado inmaduro. Por su parte la sanguinarina es mayoritaria en la raíz y las semillas maduras. Se desconoce el origen de la sanguinarina presente en semillas maduras, pudiendo ser transportada de otros tejidos, como la raíz. Sin embargo, este alcaloide no se ha logrado detectar en los tallos ni en el látex. El origen de estos alcaloides podría ser posible en los tejidos del propio fruto, incluyendo la propia semilla considerando que el fruto de *A. mexicana* produce berberina y que tanto la berberina y la sanguinarina comparten intermediarios biosintéticos comunes. En este trabajo se propone conocer los mecanismos de distribución de los alcaloides en distintas etapas de desarrollo del fruto de *A. mexicana*, desde un panorama que abarque la presencia de los alcaloides por distintos tejidos del fruto y así como su relación con la abundancia de los transcritos de los genes que codifican a las proteínas que participan en la biosíntesis y en su transporte celular.

HIPÓTESIS

- La sanguinarina presente en las semillas maduras de *Argemone mexicana*, proviene de la biosíntesis *in situ* de este tejido.

OBJETIVO GENERAL.

- Analizar la capacidad de biosíntesis de alcaloides en fruto y semilla de *Argemone mexicana*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Establecer los patrones de distribución de los alcaloides sanguinarina y berberina en los tejidos del fruto (septum intralocular, pericarpio y semilla) en diferentes etapas de desarrollo.
2. Analizar la abundancia relativa de los transcritos correspondientes al menos a tres genes involucrados en la ruta de biosíntesis de los alcaloides sanguinarina y berberina en los diferentes tejidos del fruto en etapas de desarrollo seleccionadas.
3. Establecer comparaciones entre la acumulación de alcaloides y de los transcritos involucrados en los diferentes tejidos del fruto analizados.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para poder responder a nuestra pregunta biológica, se ha diseñado un plan para analizar los alcaloides en frutos y semillas de *A. mexicana* en distintas etapas de desarrollo (figura 1.20). En primera instancia se partirá con la determinación de los estadios de crecimiento. Luego para conocer cambios en los tejidos durante el desarrollo se cuantificará el peso fresco y el peso seco en cada estadio de crecimiento. Posteriormente se hará la extracción y cuantificación de los alcaloides sanguinarina y berberina. Además se realizará un estudio molecular, midiendo la abundancia de los transcritos génicos de las enzimas que participan en la biosíntesis de estos alcaloides.

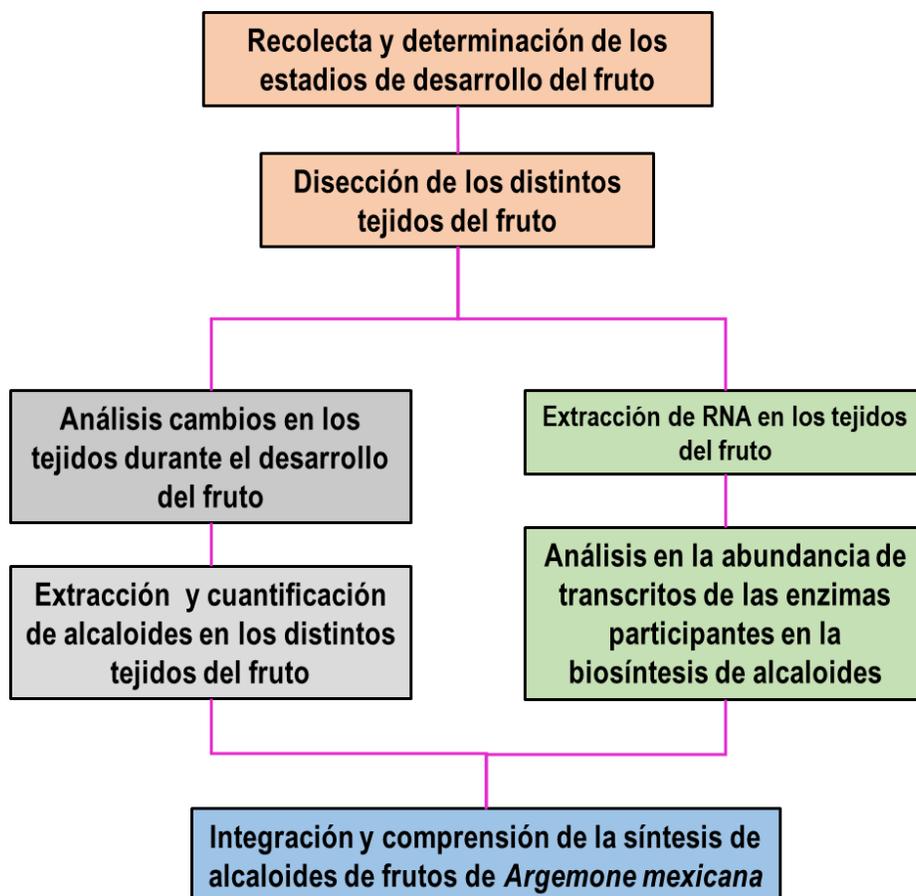


Figura 1.22. Estrategia experimental. Se muestra el diagrama de flujo a seguir de las actividades para conocer la biosíntesis de alcaloides.

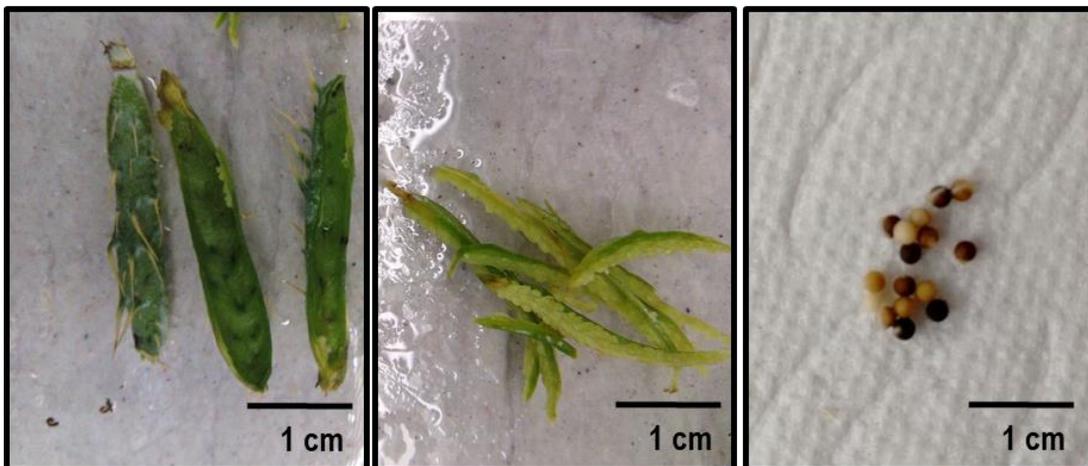
CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal. Frutos de *A. mexicana* fueron colectados de poblaciones silvestres en diferentes puntos de la ciudad de Mérida. Los frutos fueron abiertos con bisturí y separados en pericarpio (PR), septum intralocular (SI) y semilla (SE) tal como se muestra en la figura 2.1. Cada componente se midió y se pesó por separado. Todo el material disectado se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su uso en los análisis de alcaloides y de ácidos nucleicos.



Capsulas de *A. mexicana*



Pericarpio (PR)

Septum (SI)

Semilla (SE)

Figura 2.1. Tejidos empleados para el análisis de alcaloides y de ácidos nucleicos. En la parte superior se muestran las cápsulas de *A. mexicana*. En la parte inferior los tejidos de la capsula separados en pericarpio (PR), septum intralocular (SI) y semilla (SE).

2.2 Determinación de los estadios de desarrollo. Se monitoreó el desarrollo de flores y frutos en plantas de *A. mexicana* en dos ocasiones distintas (en enero y en febrero de 2018) en una población silvestre localizada en los alrededores del CICY. El tiempo de desarrollo del fruto se registró a partir de la emergencia de los botones florales hasta la dehiscencia del fruto y de manera arbitraria se determinaron siete estadios de desarrollo de acuerdo a la altura del fruto y a las coloración de las semilla descritas, ambos descritas en la figura 3.1 y 3.2 correspondiente al apartado de los resultados de este documento. Las características de las semillas se analizaron mediante un microscopio estereoscópico iluminado Leica zoom 2000 modelo Z45V.

2.3 Cambios durante el desarrollo del fruto. Con el fin de caracterizar el desarrollo y estimar el crecimiento de las cápsulas, se cosecharon 10 frutos de cada estadio y estos fueron separados en pericarpio (PR), septum intralocular (SI) y semillas (SE), como se mencionó anteriormente. Cada tejido fue pesado antes y después del proceso de liofilización.

2.4 Extracción de los alcaloides. Se tomaron 100 mg de cada tejido liofilizado (pericarpio, septum y semillas) por separado. Cada tejido fue molido y luego mezclado con 15 mL de MeOH e incubado en agitación durante dos horas. Se tomaron 1.5 mL del extracto recuperado, este fue depositado en tubo de ultracentrífuga para ser secado a presión reducida. El residuo fue resuspendido en 100 μ L de MeOH grado HPLC. El extracto fue separado por cromatografía de capa fina (CCF), aplicando 1 μ L de cada extracto en placas de sílica gel. Para la separación de sanguinarina y berberina se utilizaron como fases móviles las mezclas (por volumen) benceno:etanol (9:1) y n-butanol: agua: NH_4OH (8:1:1), respectivamente (Monforte-González et al. 2012). Una vez desarrollada la cromatografía, los alcaloides fueron identificados comparando contra los estándares comerciales por su valor de R_f (0.36 y 0.32 para sanguinarina y berberina, respectivamente) y patrón de autofluorescencia (rojo-naranja y azul-verdoso para sanguinarina y berberina, respectivamente). Los contenidos de alcaloides se analizaron por autofluorescencia *in situ*, después de la separación cromatográfica, utilizando un densitómetro TLC Scanner 4 Camag, operado por el programa WinCats 2.1 (Monforte-González et al., 2012)

2.5 Análisis de la presencia de alcaloides en la testa de semillas maduras de *A. mexicana*. Para analizar la presencia de alcaloides en las semillas, éstas se lavaron con amortiguadores de fosfatos a diferentes valores de pH con agitación y a diferentes tiempos. Los amortiguadores de NaHPO₄ se prepararon a una concentración de 0.2 M y a pH ácido, neutro y básico (5, 7, 8 y 10, respectivamente), además se incluyeron MeOH, H₂O destilada y NH₄OH al 10% tal como lo describe Xool-Tamayo y colaboradores (2017). Se pesaron 500 mg de semillas de *A. mexicana* (aproximadamente 255 unidades) y se incubaron en 2 mL de cada solución mencionada anteriormente y se dejó en agitación por 1, 3, 12 y 24 h, a temperatura ambiente. El disolvente recuperado se transfirió a un tubo nuevo y los alcaloides fueron extraídos agregando 500 µL de NH₄OH y 1.5 ml de acetato de etilo. El tubo fue agitado vigorosamente y puesto en reposo hasta conseguir la división de fases. La fase orgánica fue transferida y secada a presión reducida y el residuo fue resuspendido en 100 µL de MeOH grado HPLC. De manera paralela, 100 mg de semillas lavadas, empleadas en este mismo experimento, se molieron y se mezclaron con metanol durante dos horas. Del extracto recuperado se tomaron 1.5 mL y este fue secado a presión reducida para luego ser resuspendido en 100 µL de MeOH grado HPLC. El análisis de los alcaloides se realizó mediante CCF, aplicando 1 µL de cada extracto en placas de silica gel, tal como se ha descrito anteriormente.

2.6 Análisis de expresión de *NCSam1*, *NCSam2*, *BBEam 1*, *BBEam2*, *CheSyn*, *StySyn* y *SOMT*. La expresión de los genes *NCSam2*, *BBEam2*, *StySyn* y *SOMT* se realizó por RT-PCR. Para ello, se obtuvo el RNA de los diferentes tejidos en las diferentes etapas de desarrollo y se emplearon cebadores específicos para cada transcrito.

2.7 Extracción de RNA. Se pesaron 500 mg de tejido que se congelaron y se pulverizaron con nitrógeno líquido, agregando 800 µL de Trizol, 500 µL de β-mercaptoetanol (2%) y 150 µL de cloroformo. La muestra se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. El ARN fue precipitado con 500 µL de isopropanol y resuspendido en 1 mL de H₂O con DEPC. La integridad del RNA fue verificada por electroforesis y mediante los valores de las absorbancias 260/280 usando un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Para algunas aplicaciones, el RNA total se extrajo utilizando el paquete PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA contaminante se eliminó con el paquete TURBO DNA-free; Life technologies). Los rendimientos y la calidad se verificaron como se describió con anterioridad.

2.8 Síntesis de cDNA. Se utilizó el paquete First-Strand cDNA Synthesis M-MLV RT (INVITROGEN). Se tomó 1 µg de RNA total previamente tratado con DNase y fue depositado en una mezcla que contenía 1 µL de oligo-dt, 1 µL de dNTP y se incubó a 65 °C por 5 minutos. Para la síntesis de la primera cadena, se añadieron 4 µL de first-strand buffer, 2 µl de DDT, 1 µl de RNAsa Out, incubando a 37 °C por 2 minutos y 1 µL (200 U/ µL) de la transcriptasa reversa M-MLV, incubando durante 50 minutos a 37 °C.

2.9 PCR. Se tomaron 100 ng de cDNA y se incubaron en una mezcla de PCR que contenía 10 µM de cebadores específicos (tabla 2.1). El programa consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C. Se emplearon 35 ciclos de 50 s a 94 °C para la desnaturalización. La temperatura del alineamiento para los distintos cebadores se describe en la tabla 2.1. La condición de la elongación fue por 1 min a 72 °C. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1% y se visualizaron en un sistema de transiluminación (Gel DocTM XR+System; BIO-RAD).

Tabla 2.1. Descripción de los oligonucleótidos empleados en los análisis de las enzimas involucradas en la biosíntesis de sanguinarina y berberina (Vergara-Olivares; 2016).

Gen	Sentido 5'-3'	Antisentido5'-3'	Tm	Longitud (pb)
<i>NCS1</i>	CATCGCTAATTACGTTCTCAAGAATCA	ATAGTAGTACATGGAATTACCTGGATGGGA	61 °C	241
<i>NCS2</i>	CGTACCATTGGAAATCCATGTCAGAA	CATCGGACGGTAATTACCCATG	61 °C	273
<i>BBE1</i>	CATCTTTGTTTCATCATCTTCTTCTTCTT	GATCCTCTTGTGCAACATCTAACGGT	64 °C	268
<i>BBE2</i>	CTCATCTTTGTTTCATCTTCTTCTGTGC	GATCCTCTTGTGCAACATCTAACGGT	64 °C	255
<i>SOMT</i>	CAGGATTTGGACCAGAAGCAC	ACGATACTCCATCCTCCTCGC	61 °C	219
<i>CheSyn</i>	CGTCCACATATTGTTTCGAATCCTC	ACGATACTCCATCCTCCACGC	61 °C	180
<i>StySyn</i>	GTTCAAATCTAGTACGTCGGCT-3'	TTCTCTGAACATTTGGTTCTCGT	56 °C	200

2.10. Análisis estadísticos. Para el análisis del crecimiento del fruto y para los contenidos de alcaloides durante el desarrollo, se utilizó el programa de Minitab 18. Para la presentación de gráficos se utilizó la paquetería Microsoft Office Excel 2018.

CAPÍTULO III**RESULTADOS**

3.1 Caracterización del desarrollo del fruto y semilla de *A. mexicana*. Para iniciar estos estudios, se realizó un seguimiento del desarrollo de los frutos en plantas de *A. mexicana*, a partir de la emergencia de los botones florales hasta que las cápsulas iniciaron el proceso de dehiscencia. Se monitoreó el desarrollo en dos ocasiones distintas. La emergencia del botón floral se registró como día 1, el inicio de la antesis ocurrió en el día 8 cuando la flor estaba completamente desplegada. Las cápsulas se detectaron a partir del día 12 (4 días post-antesis; DPA) y para el día 24 (12 DPA) alcanzaron la madurez, iniciando para el día 27 (15 DPA) el proceso de dehiscencia (Fig. 3.1).

Se determinaron de manera arbitraria siete estadios de desarrollo de acuerdo al tamaño y características fruto (Figs. 3.1 y 3.2). Los estadios fueron definidos de acuerdo a los siguientes criterios;

- Estadio 1 (**E1**). Frutos de 4 días post-antesis (DPA), de 1 x 0.3 cm (largo x ancho), con semillas translúcidas y friables.
- Estadio 2 (**E2**). Frutos de 6 DPA, de 2 x 0.5 cm, con semillas blanquecinas y friables.
- Estadio 3 (**E3**). Frutos de 9 DPA, de 2 x 1 cm, con semillas blancas rígidas.
- Estadio 4 (**E4**). Frutos de 11 DPA, de 3 x 1.2 cm, con semillas blancas firmes.
- Estadio (**E5**). Frutos de 14 DPA, de 3 x 1.4 cm, con algunas semillas tornado a pardo y firmes.
- Estadio 6 (**E6**). Frutos de 16 DPA, de 4 x 1.4 cm, con semillas oscuras y firmes (maduras).
- Estadio 7 (**E7**). Frutos de 19 DPA, de 4 x 1.6 cm, con semillas negras y firmes, presenta la decoloración y la apertura del carpelo.

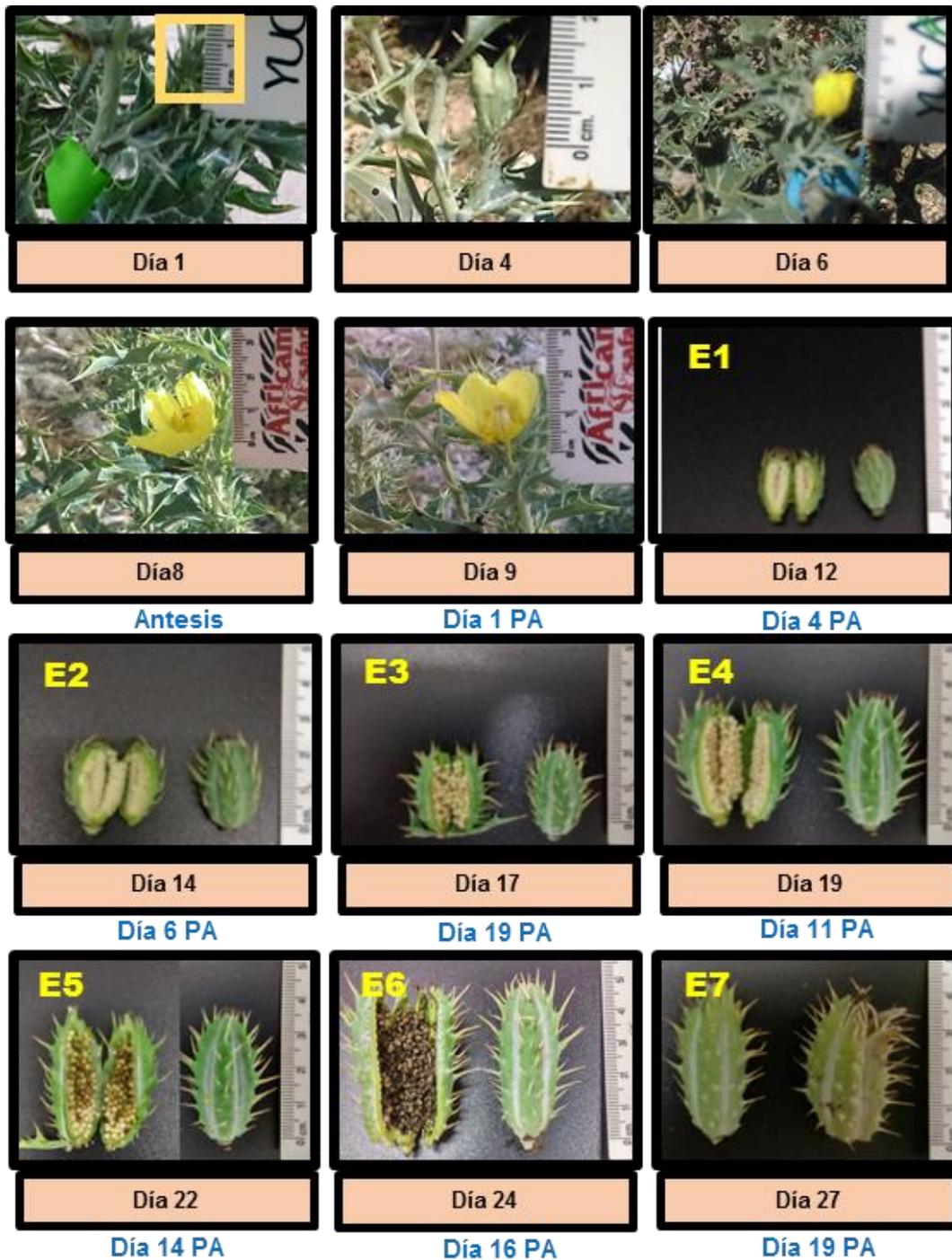


Figura 3.1 Tiempo del desarrollo de la flor y fruto de *A. mexicana* y la determinación de los **estadios**. El periodo inició desde la aparición del botón floral hasta la dehiscencia del fruto. Para el fruto los estadios de desarrollo del fruto fueron nombrados usando la siguiente nomenclatura de E1 a E7 de acuerdo a las características del tamaño y las características de la semilla. PA= post-antesis.



Figura 3.2 Caracterización de las semillas durante el desarrollo del fruto de *A. mexicana*. Fila A= Semillas translúcidas friables. Fila B= Semillas blancas rígidas. Fila C= semillas pardas firmes. Fila D= Semillas oscuras. Fila E= Semillas negras cóncavas (frutos dehiscentes).

3.2 Caracterización del desarrollo de las cápsulas de *A. mexicana*. Con el fin de caracterizar el desarrollo de las cápsulas, se cosecharon 10 frutos de cada estadio y estos fueron separados en pericarpio (PR), septum intralocular (SI) y semillas (SE), como ya se describió. También se registró el crecimiento del fruto completo (FC). Cada tejido fue pesado antes y después del proceso de liofilización para estimar la ganancia de biomasa.

Los frutos completos (FC) mostraron un continuo crecimiento, tanto en peso fresco y en peso seco hasta en el E6, después de esta etapa el peso fresco disminuyó más del 30%; (de 1900 a 1249 mg; figura 3.3), mientras que el peso seco se mantuvo en valores similares (alrededor de 660 mg; figura 3.4). Al analizar los diferentes componentes del fruto, se observó que la disminución del peso fresco se debió principalmente la caída en los valores del pericarpio (PR) cerca del 40 % (de 654 mg a 388 mg; figura 3.3) lo cual pudo asociarse con la desecación necesaria para la abertura de la cápsula (figura 3.1). El peso fresco de la semilla (SE) también disminuyó en este periodo cerca del 20% (de 864 a 689 mg; figura 3.3), coincidiendo con el secado de las semillas, observado en la figura 3.2. El septum intralocular (SI) mostró ganancia en peso fresco solo hasta el E4, perdiendo peso conforme transcurren las siguientes etapas de desarrollo (figura 3.3). Los valores del peso en el SI no se determinaron en E1 por la dificultad en la separación del tejido. Como ya se indicó, la disminución del peso fresco de los tejidos en E7 sugiere que el fruto sufrió una deshidratación, lo que se puede relacionar con el fenómeno de dehiscencia, una etapa donde el fruto muestra la apertura de los carpelos y una decoloración de la cápsula (figura 3.1) y el secado de las semillas (figura 3.2).

El análisis del contenido de materia seca (figura 3.4) mostró que en todos los componentes se obtenía la ganancia de biomasa hasta el E6, después de esta etapa, el PR presenta una pérdida del peso cerca del 50 % (de 134 a 66 mg; figura 3.4). Por su parte, los valores de SE en E6 presenta una pérdida del 7% (de 540 a 502 mg; figura 3.4) y el SI una pérdida del 36 % (de 66 a 42 mg). Las comparaciones del peso seco entre estos tres componentes se pueden mencionar que la semilla es un tejido que tiene prioridad en la ganancia de biomasa durante el desarrollo de las cápsulas de *A. mexicana*.

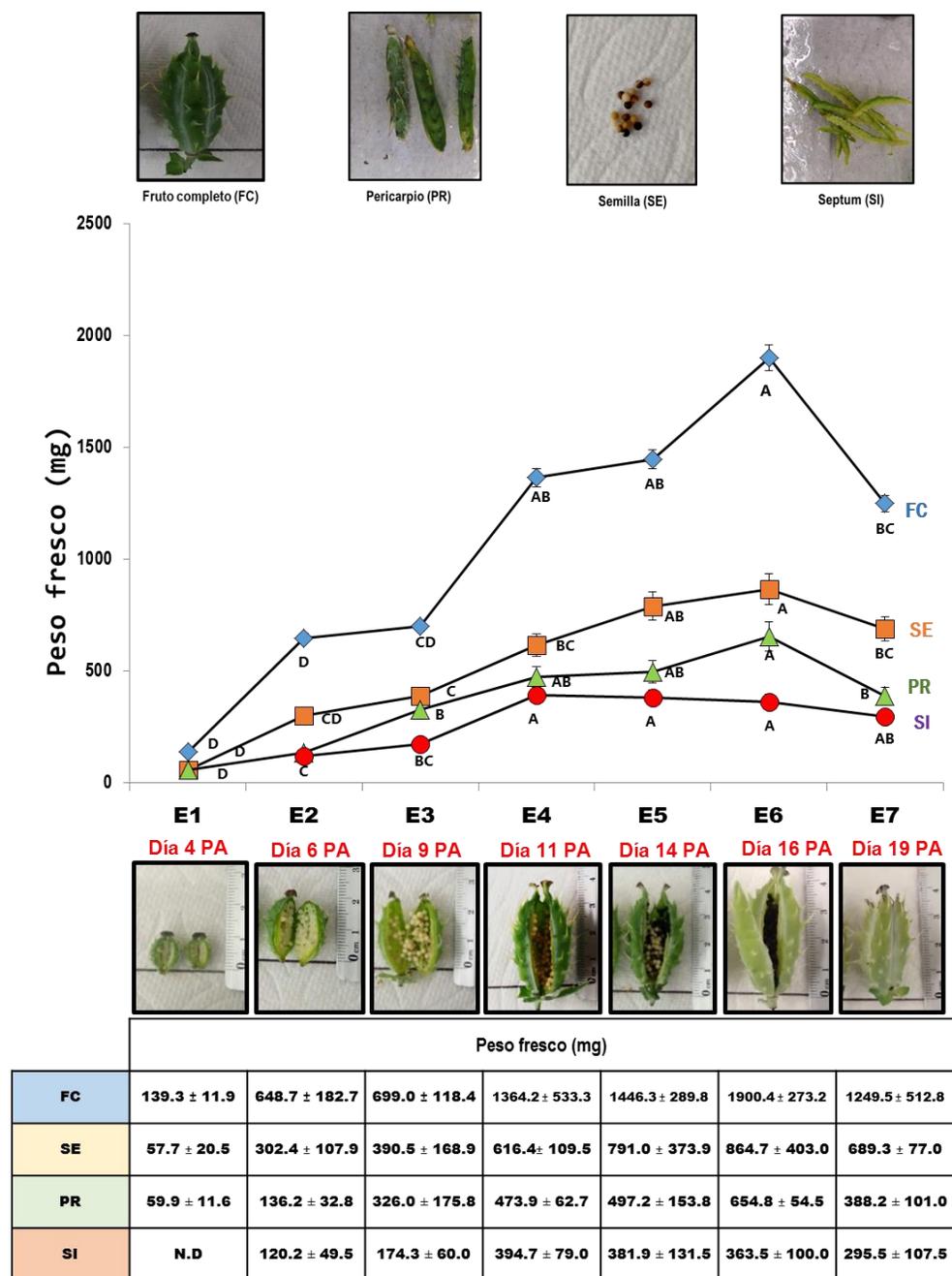


Figura 3.3 Perfil de crecimiento de la cápsula completa de *A. mexicana* y los tejidos que la componen (pericarpio, PR, semillas, SE y septum intralocular; SI) estimado en valores de peso fresco. El fruto completo (FC) mostró un continuo crecimiento hasta en el E6, el valor del peso disminuyó más del 30%; (de 1900 a 1249 mg). El PR mostró una pérdida cerca del 40 % (de 654 mg a 388 mg; figura 3.3). El peso de la SE disminuyó en este periodo cerca del 20% (de 864 a 689 mg). El SI mostró ganancias en peso fresco solo hasta el E4, perdiendo peso conforme transcurren las siguientes etapas de desarrollo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).ND= no determinado.

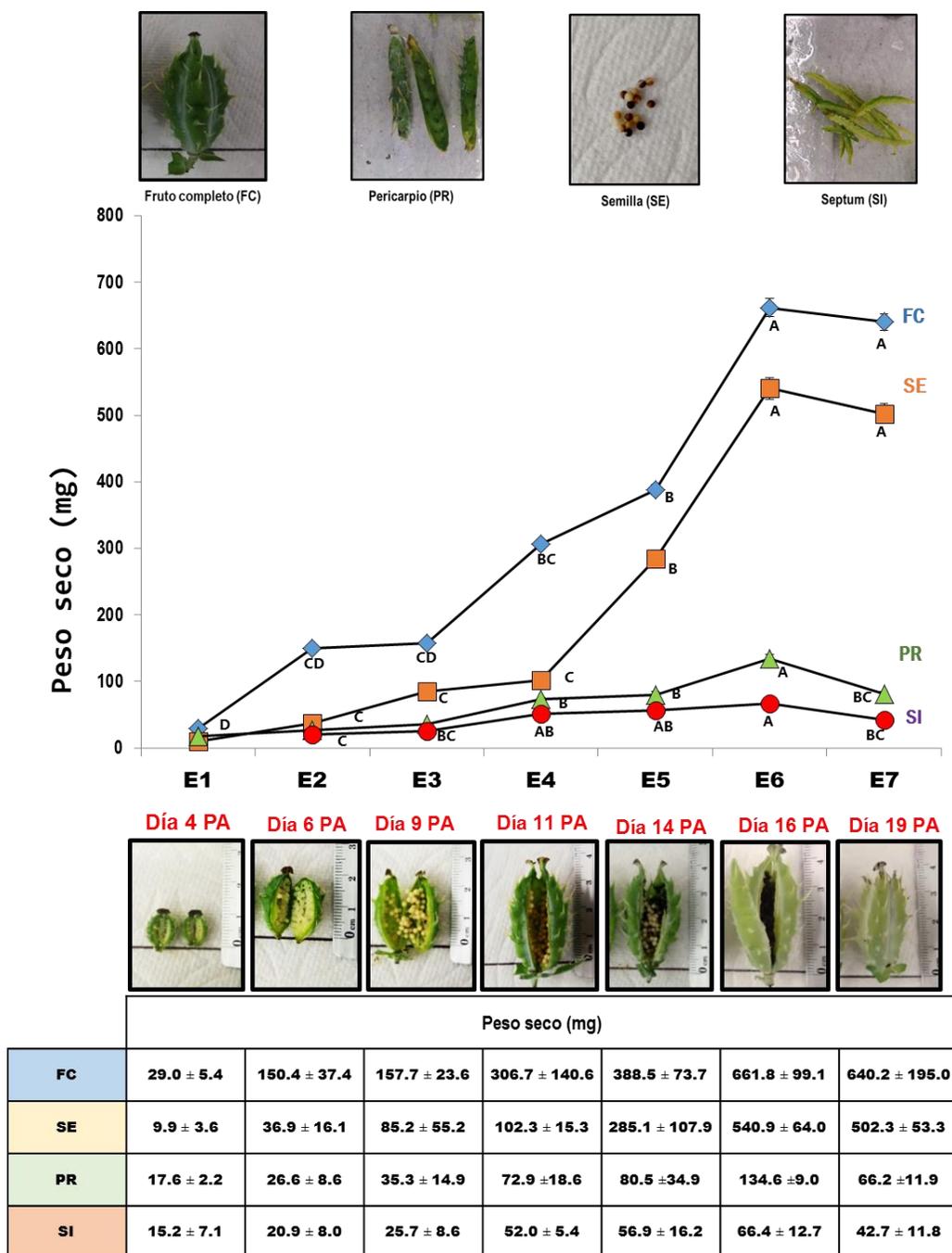


Figura 3.4 Perfil de crecimiento de la cápsula completa de *A. mexicana* y sus componentes (pericarpio, PR, semillas, SE y septum intralocular; SI) estimado en valores de peso seco. El análisis del contenido de materia seca mostró que en todos los componentes se obtenía la ganancia de biomasa hasta el E6, después de esta etapa, el PR presenta una pérdida del 50 % (de 134 a 66 mg). La SE presenta una pérdida del 7% (de 540 a 502 mg; figura 3.4) y el SI una pérdida del 36 % (de 66 a 42 mg). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

3.3 Acumulación de berberina y sanguinarina durante el desarrollo de frutos de *A. mexicana*. La cuantificación de los alcaloides se realizó por densitometría *in situ* en los componentes del fruto (PR, SI Y SE). Las cantidades de berberina en PR (figura 3.5), muestra que el alcaloide es detectado en E1 con un valor de 0.750 mg sobre gramo de peso seco (mg/g.p.s.). Los valores de berberina incrementaron hasta E3 (1.031 mg/g.p.s.) donde el fruto presenta una altura de 2 cm (figura 3.1) y manteniendo la ganancia en biomasa (figura 3.4). Las cantidades de berberina disminuyeron en el E4 (0.806 mg/g.p.s.) y E5 (0.688 mg/g.p.s.) respectivamente; sin embargo, en ambos estadios mencionados, el PR mantiene un constante crecimiento reflejado en la ganancia de biomasa (figura 3.4). Las cantidades de berberina vuelven a incrementar en E6 (1.522 mg/g.p.s.) y E7 (2.464 mg/g.p.s.). Los valores más altos de berberina se registran en E7; en esta última etapa el fruto sufre una pérdida en la biomasa (figura 3.4) relacionada con el inicio de la dehiscencia del fruto (figura 3.1). La sanguinarina no fue detectada en ninguno de los estadios analizados. Esto datos se relacionan con el trabajo Rubio Piña (2009) en cuanto al contenido de berberina en cápsulas sin semillas.

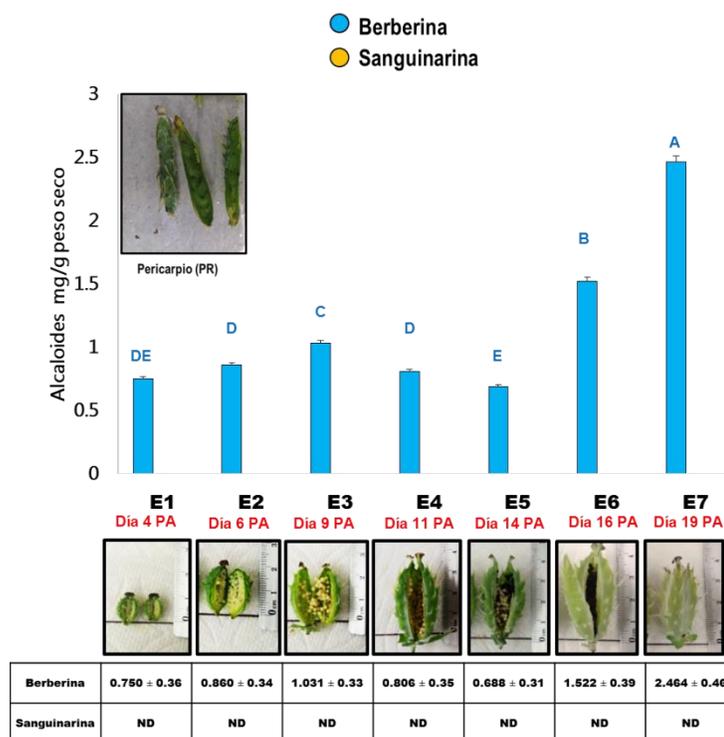


Figura 3.5. Acumulación de alcaloides en pericarpio durante el desarrollo de frutos de *A. mexicana*. La berberina fue detectada en todos los estadios de desarrollo analizados. La sanguinarina no fue posible detectarla en este tejido. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). ND=no detectado

La cuantificación de alcaloides en SI (figura 3.6), la berberina es detectada en todos los estadios de desarrollo y sus valores incrementan en cada etapa de desarrollo. Las cantidades de berberina en SI en comparación con PR (figura 3.5) son similares en ambos tejidos a lo largo del desarrollo. En este mismo tejido la sanguinarina es detectada a partir del E5 (0.021 mg/g.p.s.) justo cuando el fruto contiene semillas pardas (figura 3.2). Las cantidades de sanguinarina continúan incrementando en E6 (0.025 mg/g.p.s.) y E7 (0.089 mg/g.p.s.) en ambas etapas el fruto logra la maduración de las semillas (figura 3.2). Los valores más altos de berberina en este componente de la capsula se registran en E7; en esta última etapa el fruto sufre una pérdida en la biomasa (figura 3.4) relacionada con la deshidratación del tejido y el inicio de la dehiscencia del fruto (figura 3.1).

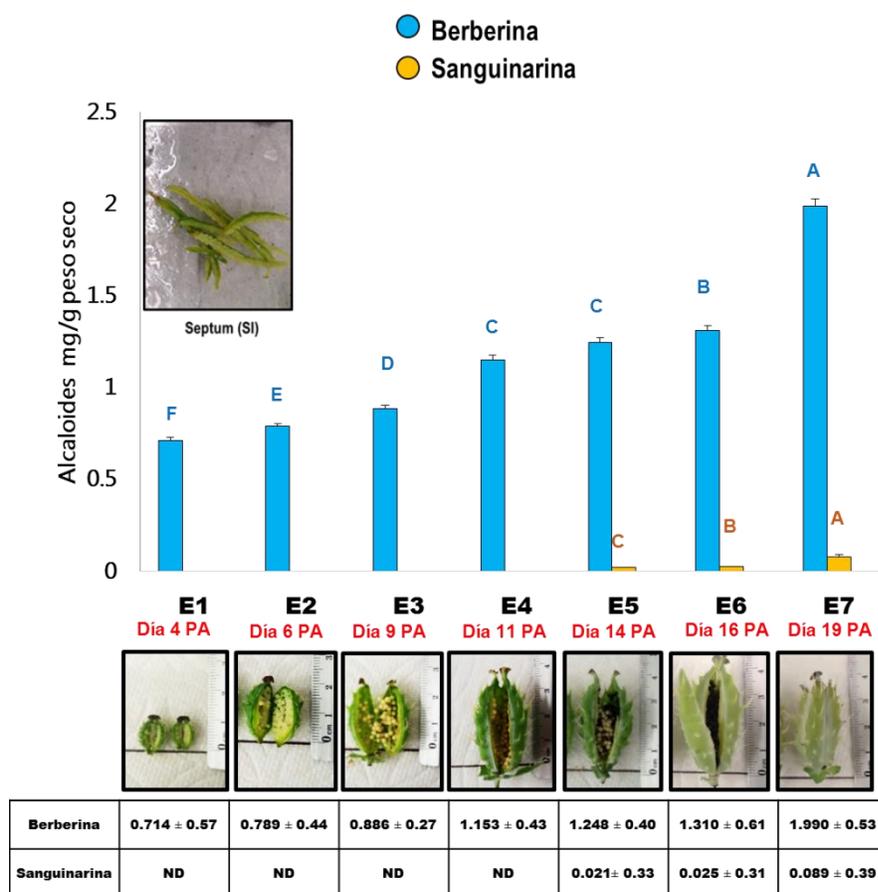


Figura 3.6. Acumulación de alcaloides en septum intralocular durante el desarrollo de frutos de *A. mexicana*. La berberina fue detectada en todos los estadios de desarrollo analizados. Pequeñas cantidades de sanguinarina se detectan a partir de E5 incrementando conforme culminan las etapas de desarrollo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). ND=no detectado.

Los análisis de alcaloides en SE (figura 3.6) muestran que la berberina se detecta desde etapas tempranas del desarrollo. Los valores más altos de berberina se presentan en E1 (0.288 mg/g.p.s.) y E2 (0.236 mg /g.p.s.), ambos estadios se caracterizan por presentar semillas inmaduras friables (figura 3.2). Las cantidades de berberina disminuyen notablemente en E3 (0.145 mg/g.p.s.) y E4 (0.36 mg/g.p.s.), etapas donde las semillas inmaduras son blancas rígidas (figura 3.2). La presencia de ambos alcaloides en SE ocurre cuando llega al E5 donde las semillas son pardas indicando el inicio de la madurez en este tejido (figura 3.2). Es interesante mencionar que justo en E5 culmina la síntesis de berberina e inicia la síntesis de sanguinarina. En el E6 las cantidades de sanguinarina alcanza un valor de de 0.489 mg/g.p.s. y las semillas son totalmente oscuras. En E7 (semillas oscuras desecadas) se detectan los valores más altos de sanguinarina (0.713 mg/g.p.s.), sin embargo, esta etapa presenta una disminución en los valores de la biomasa (figura 3.4) relacionada con la deshidratación que sufre el tejido cuando inicia la dehiscencia del fruto (figura 3.2).

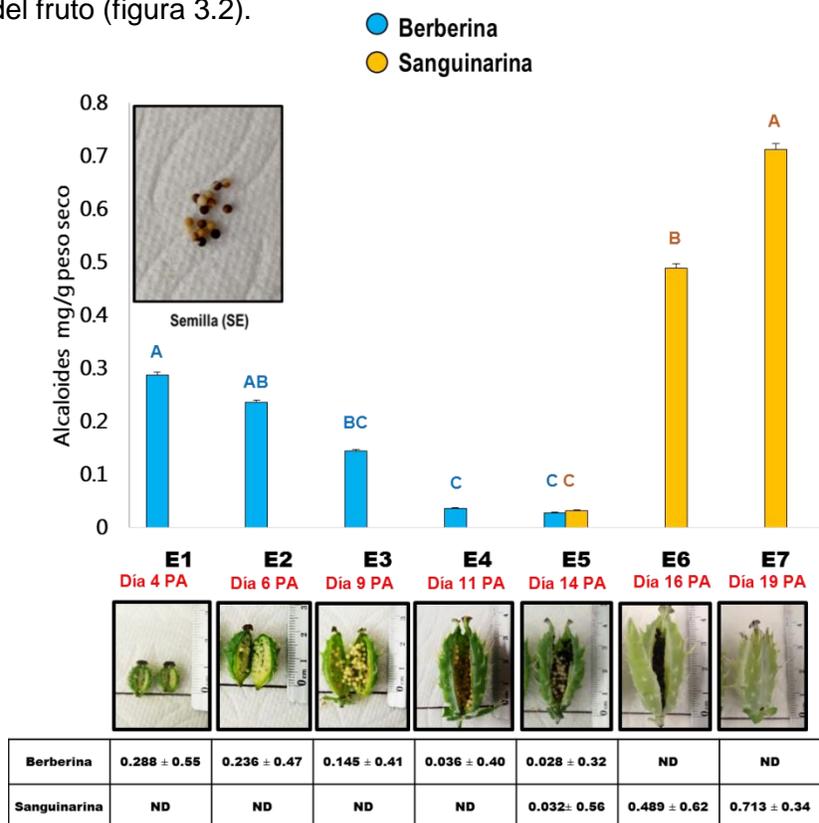


Figura 3.6. Acumulación de alcaloides en semillas durante el desarrollo de frutos de *A. mexicana*. La berberina fue detectada hasta E5, una etapa donde el fruto presenta semillas pardas. Justo en esta misma etapa por primera vez se detecta la presencia de sanguinarina, elevando su contenido conforme culmina el desarrollo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). ND=no detectado.ND= no detectado

3.4 Análisis moleculares en la biosíntesis de alcaloides en frutos de *A. mexicana*.

Para los análisis moleculares (figura 3.7), se seleccionaron cuatro estados de desarrollo (E2, E4, E5 y E6) en base a las diferencias significativas en los valores de alcaloides registradas en SE, PR y SI (figura 3.7, parte superior). Los genes analizados corresponden a *NCSam1*, *NCSam2*, *BBEam1* y *BBEam2*, como indicadores del tramo común en la ruta de síntesis de ambos alcaloides; además también se añadió a este estudio el análisis del gen *SOMT*, para la ruta específica de berberina, así como el gen *StySyn* y *CheSyn*, para la ruta exclusiva de sanguinarina (figura 3.7 parte inferior).

Los resultados mediante PCR punto final, demuestran que el SI pareciera no estar contribuyendo en la generación de los transcritos correspondientes para la biosíntesis de los alcaloides, sin embargo, es un tejido que es capaz de acumular berberina (figura 3.7 parte superior).

En PR, los transcritos de los genes *NCSam2*, *BBEam1* y *BBEam2* solo tienen presencia en las etapas inmaduras del desarrollo del fruto (E2 y E4) mientras que los transcritos de *NCSam1*, *SOMT* y *StySyn* están presentes en todas las etapas de desarrollo analizadas (figura 3.7). Es interesante resaltar que este tejido está generando los transcritos del gen *StySyn* que es específico para la producción de sanguinarina, sin embargo, PR es un tejido que sólo acumula berberina (figura 3.7, parte superior). También es posible mencionar que los transcritos de los genes *NCSam1*, *BBEam1* y *BBEam2* no son detectados en E5 (inicia el oscurecimiento de las semillas); ni en E6 (cuando las semillas son oscuras y el carpelo se decolora), etapas maduras del fruto, no obstante, este tejido aún continúa acumulando berberina (figura 3.7, parte superior).

Los estudios moleculares realizados en SE (figura 3.7) muestran que los transcritos de *NCSam2*, *BBEam1* y *BBEam2* es posibles hallarlos en las etapas maduras de este tejido (E5, cuando la testa comienza a oscurecerse; y E6, cuando la testa está completamente oscura). En este mismo tejido los transcritos correspondientes a *NCSam1* y *StySyn* están presentes en todas las etapas de desarrollo analizadas. Para el caso de los transcritos del gen *CheSyn*, este se detectó en E4 y E6. Por otra parte, los transcritos del gen *SOMT* no estuvieron presentes en ninguno de los estadios analizados de la semilla. Es necesario hacer recordar que las semillas en la etapa inmadura sólo acumulan berberina, sin embargo, no fue posible hallar los genes *NCSam1*, *BBEam1*, *BBEam2* y *SOMT* en las etapas E2 y E4 pertenecientes a los estados inmaduros de la semilla.

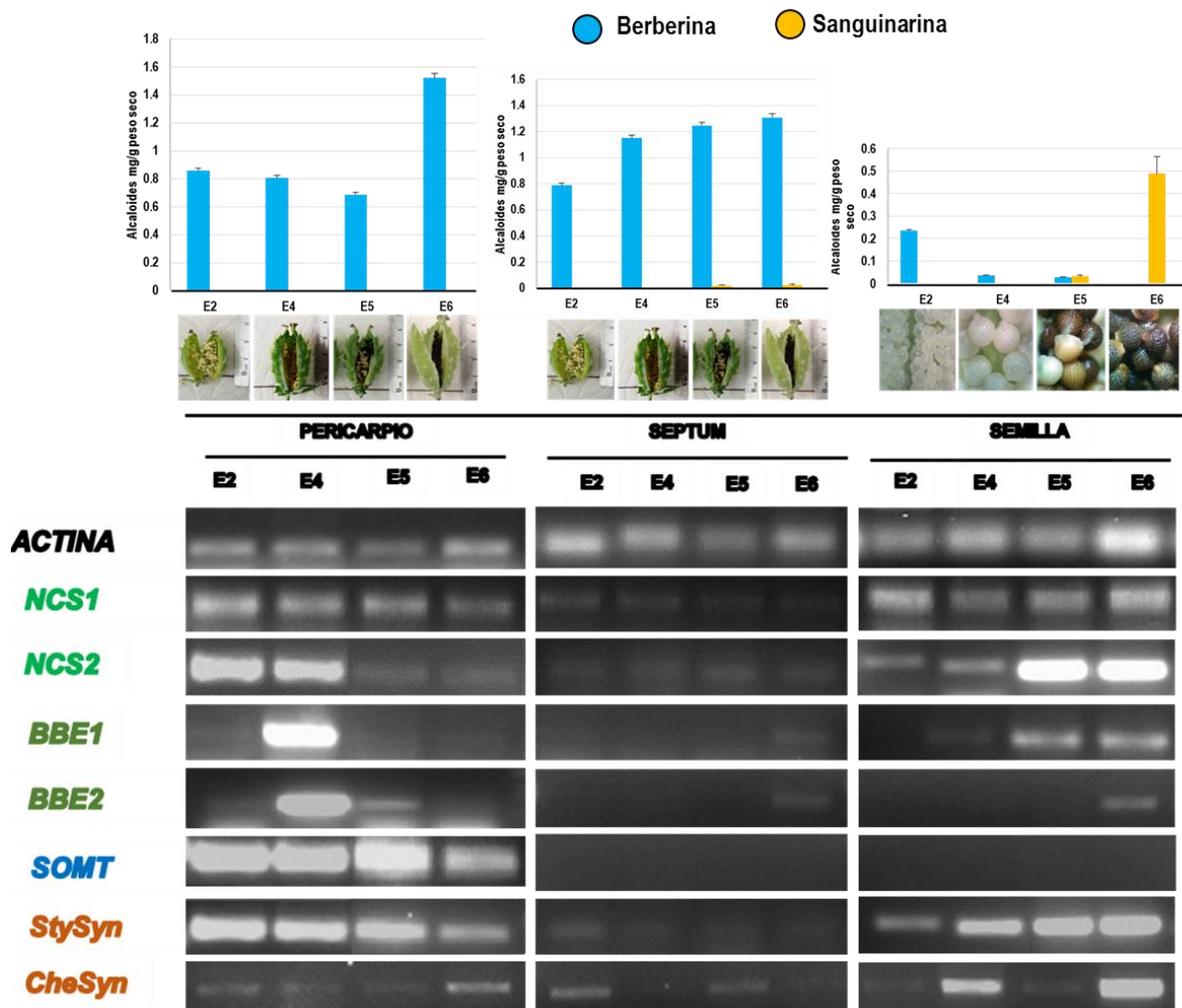


Figura 3.7 Análisis moleculares en tejidos del fruto de *A. mexicana*. Los estudios moleculares se realizaron mediante PCR punto final. Los genes analizados fueron *NCSam1*, *NCSam2*, *BBEam1* y *BBEam2*, como indicadores del tramo común en la ruta de síntesis. El gen *SOMT* para la ruta específica de berberina. Los genes *StySyn* y *CheSyn* para la ruta exclusiva de sanguinarina. Para una mejor comparación se muestra el contenido de alcaloides por cada tejido durante los estadios analizados (parte superior).

3.5 Estudio de la liberación de alcaloides en semillas de *A. mexicana*. Evidencias sugieren que la acumulación de la sanguinarina ocurre específicamente en la testa de la semilla y posiblemente no se libera al medio durante el proceso de germinación (Xool Tamayo et al., 2017). Se realizó un ensayo minucioso para analizar este fenómeno replicando algunas condiciones del suelo. Semillas maduras fueron lavadas con MeOH, agua destilada, hidróxido de amonio (10%), y buffers de fosfato de sodio (0.2 molar) en condiciones ácidas y alcalinas (pH 5, pH 7, pH 8, pH 10). Los tiempos de agitación fueron

1, 3, 12 y 24 horas por separado. Mediante CCF, los resultados mostraron que solo los lavados de semillas expuestas en NH_4OH y metanol logran la liberación de sanguinarina (Fig. 3.8), en NH_4OH se observó la presencia de dicho alcaloide a partir de las doce horas. En el tratamiento con MeOH, la liberación de la sanguinarina se observa en todos los rangos de tiempos analizados.

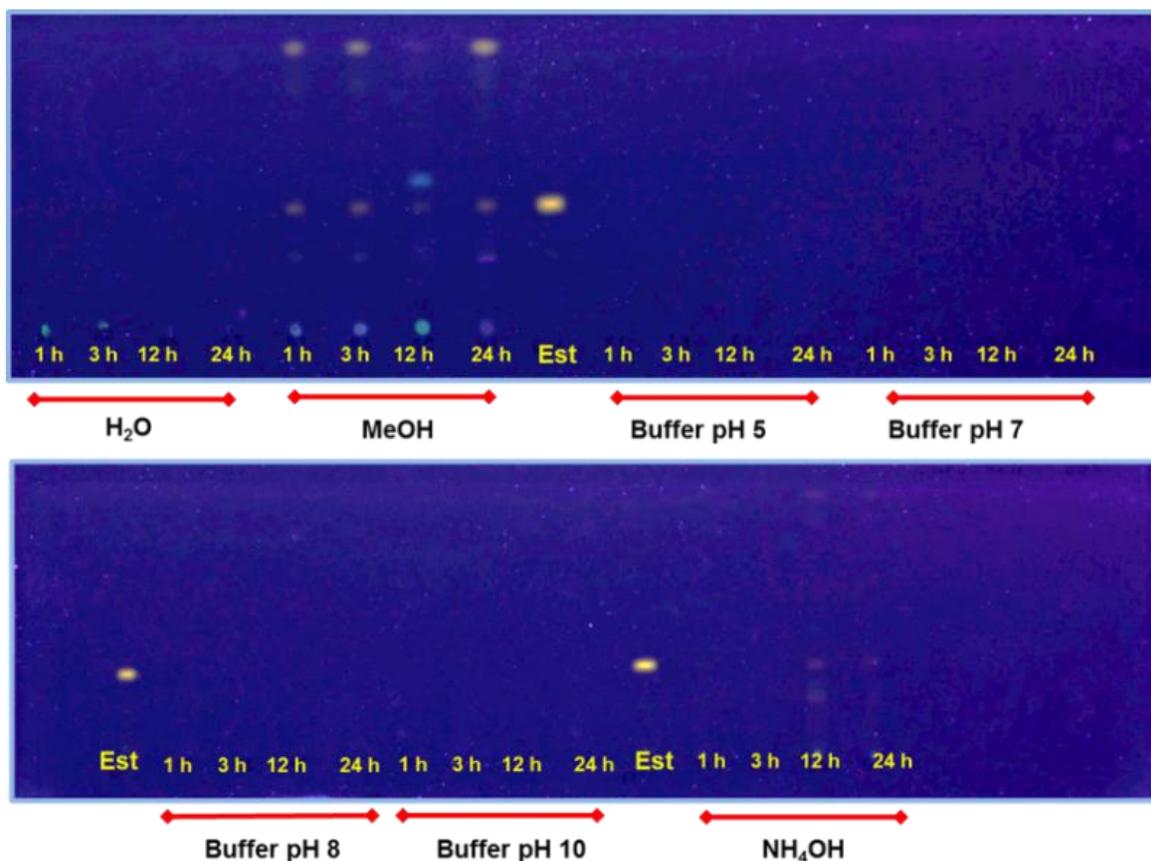


Figura 3.8. Lavados de semillas con distintos disolventes. Los lavados a partir de semillas expuestas a metanol (superior), muestran la presencia de sanguinarina en todos los rangos de tiempos. Por otra parte, los lavados de semillas expuestas a NH_4OH (inferior), mostraron una tenue presencia de sanguinarina solo en los tiempos de 12 y 24 horas. En las demás condiciones no se observó la presencia de sanguinarina.

Las semillas lavadas empleadas en este mismo ensayo se utilizaron para la extracción de sanguinarina (Fig. 3.9). Los perfiles cromatográficos obtenidos mostraron cantidades significativas de sanguinarina en todas las condiciones de lavado de las semillas, así como en los distintos tiempos, indicando que efectivamente dicho metabolito es resguardado durante el periodo de germinación.

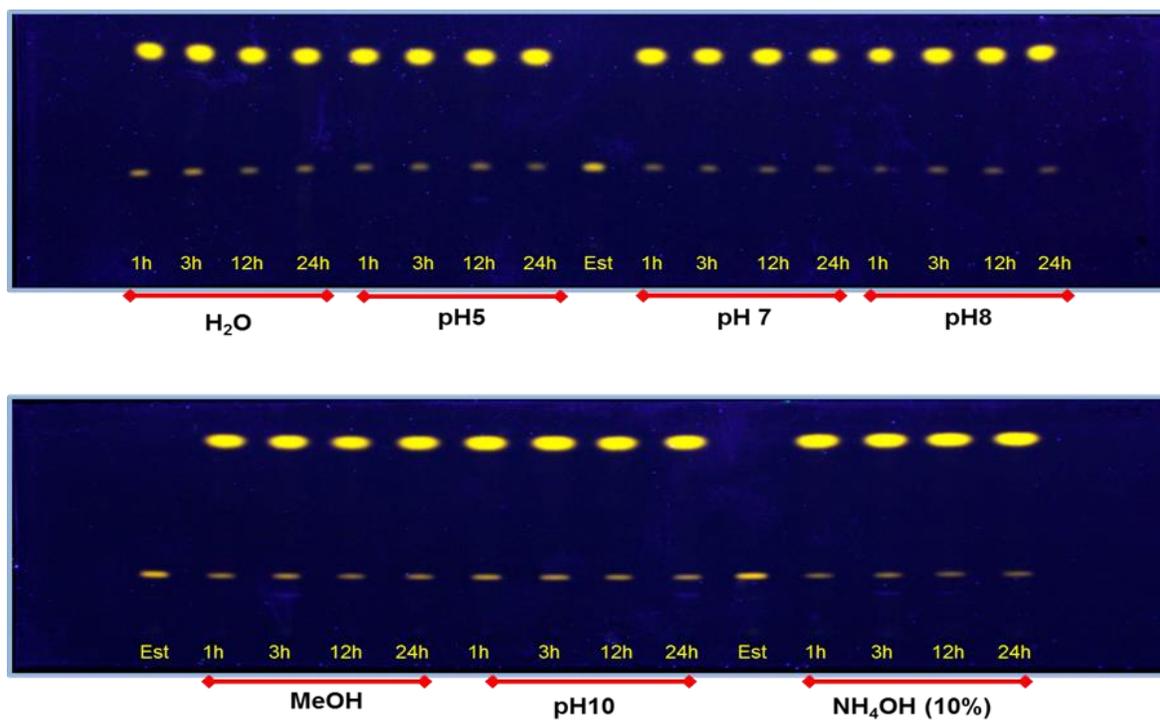


Figura 3.9. Extracción de alcaloides de a partir de semillas lavadas con distintos solventes. Los perfiles cromatográficos obtenidos mostraron presencia significativa de sanguinarina en todas las condiciones. Sugiriendo que este tejido preserva el alcaloide durante el proceso de germinación.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

El lapso de crecimiento del fruto transcurrió por 27 días. Este lapso consistió desde la emergencia del botón floral hasta la dehiscencia del fruto. El día 8 la flor está completamente desplegada y fue registrado como el inicio de la antesis. Las cápsulas se detectaron a partir del día 12 (4 días post-antesis; DPA) y para el día 24 (12 DPA) habían alcanzado la madurez. El día 27 (15 DPA) inicia la dehiscencia del fruto (figura 3.1). En el fruto se establecieron de manera arbitraria siete estadios de desarrollo de acuerdo a la altura de la cápsula (figura 3.1). Durante el desarrollo las semillas presentaron distintas tonalidades. En E1 y E2, el fruto presenta semillas translúcidas friables. En E3 y E4 el fruto almacena semillas blancas rígidas. En E5 la cápsula preserva semillas pardas. En E6 el fruto logra obtener semillas oscuras. En E7 los frutos dehiscentes reservan semillas oscuras desecas. El desarrollo de la cápsula y de la semilla en *A. mexicana* es muy similar al desarrollo de las cápsulas de *P. somniferum* que también es una papaverácea. Después de la antesis, la planta de opio expone una cápsula con una coloración verde intensa. La cápsula se hincha conforme transcurre el desarrollo. Cuando el fruto entra a la etapa de madurez, el pericarpio presenta una decoloración y en la etapa de la dehiscencia los carpelos se despliegan (Marh Susan, 2017). Las semillas de la adormidera también presentan una coloración blanquecina cuando se encuentran en estado inmaduro, luego se tornan pardas cuando empiezan a madurar, al final del desarrollo las semillas se oscurecen y se desecan (Kourmpetli y Drea, 2014; Marh Susan, 2017).

Sobre los cambios de peso durante el desarrollo del fruto, los resultados indican que tanto en peso fresco (figura 3.3) y en peso seco (figura 3.4), todos los tejidos aumentaron su respectivo peso conforme transcurre el desarrollo del fruto hasta E6, después de esta etapa, los componentes del fruto muestran una notable disminución en los valores de la biomasa. La disminución del peso de los tejidos en el E7 indica que el fruto sufre una deshidratación relacionada al fenómeno de dehiscencia, una etapa donde el fruto muestra la apertura y la decoloración de los carpelos (figura 3.1), así como la desecación de las semillas (figura 3.2).

En el análisis de contenido de alcaloides durante el desarrollo del fruto, el SI y el PR son tejidos que durante todo el desarrollo del fruto solo acumulan berberina (figura 3.5 y figura 3.6, respectivamente). Las capsulas en estado maduro contienen valores 2 mg/g.p.s de berberina, valores superiores a los contenidos de berberina en tejidos de tallo y hojas de

la misma planta (Rubio piña 2009; Vázquez-flota et al, 2018). Aunque el SI muestra cantidades trazas de sanguinarina, se sugiere que la causa es debido a una contaminación por parte de la semilla, puesto que ambos tejidos están ligados (figura 1.20). En SE, la berberina se detecta durante los primeros estados de desarrollo, su cantidad disminuye hasta presentarse por última vez en E5 una etapa donde la testa de la semilla comienza a oscurecerse. En esta misma etapa se logra detectar la sanguinarina y sus valores aumentan conforme culmina el estado de desarrollo del fruto. La semilla es el único tejido capaz de acumular ambos alcaloides (figura 3.8), lo cual difiere de las semillas de *P. somniferum*, que están libres de alcaloides debido a que los vasos lactíferos terminan en la placenta y no llegan al óvulo en desarrollo (Kourmpetli y Drea, 2014). El oscurecimiento de la testa coincide justamente con la presencia de la sanguinarina en la semilla madura, sugiriendo que este alcaloide puede ser un indicador de la madurez de este tejido. Los contenidos más altos de sanguinarina se registraron la última etapa de desarrollo (0.8 mg/g.p.s.) cuando las semillas están desecadas (figura 3.2); estos valores son superados por las cantidades de sanguinarina en las raíces de la misma planta con valores cerca de de 1.2 mg/g.p.s. (Vázquez-Flota et al, 2018) y son similares a las cantidades de sanguinarina en raíces de plantas juveniles de la especie *S. canadensis* con valores de 0.9 mg/g.p.s. (Campbell et al, 2007).

Como ya se ha mencionado, los valores más altos de alcaloides en todos los componentes del fruto se detectaron en la última etapa de desarrollo, superando las cantidades de en la producción de alcaloides en los demás tejidos de la misma planta. Este dato es útil para la cosecha de estos metabolitos hasta que los frutos se hallan en la etapa madura, lo que difiere al tiempo de cosecha de opio en la adormidera (*P. somniferum*) que se realiza en etapas tempranas de la cápsula debido a que en etapas maduras la mayoría de los metabolitos de interés se reducen a otros compuestos (Labanca et al, 2018).

Los análisis moleculares demuestran que el SI pareciera no estar contribuyendo en la generación de los transcritos correspondientes para la síntesis de los alcaloides, sin embargo, es un tejido que es capaz de acumular berberina (figura 3.7 parte superior). En PR, los transcritos del gen *SOMT* es posible hallarlo en todas las etapas de desarrollo analizadas. En este mismo tejido, los transcritos de los genes *NCSam1*, *BBEam1* y *BBEam2* están presentes en las etapas inmaduras del desarrollo del fruto (E2 y E4) y están ausentes en las etapas de estado inmaduro (E5 y E6), no obstante, este tejido es

capaz de acumular berberina durante todo el desarrollo; se sugiere que el tallo contribuye con la distribución de los transcritos movilizándolos hasta el pericarpio, ya que datos mostrados por el grupo de Vázquez-Flota y colaboradores (2018) demuestran que el tallo es un tejido capaz de generar los transcritos necesarios para la biosíntesis de sanguinarina, berberina y querelitrina.. De manera contraria, en SE los transcritos de los genes del tramo común *NCSam2*, *BBEam1* y *BBEam2*; y el transcrito del gen *SOMT*, específico de berberina están ausentes en las etapas inmaduras (E2 y E4) cuando las semillas producen berberina. En las etapas de estado maduro (E5 y E6) es posible hallar los transcritos del tramo común: *NCSam2*, *BBEam1* y *BBEam2*; y los transcritos específicos para sanguinarina: *StySyn*, y *CheSyn*; justo cuando este tejido produce sanguinarina. De acuerdo con lo que se menciona anteriormente se sugiere que el origen de la berberina podría ocurrir a partir de una biosíntesis *ex situ*: donde la berberina es sintetizada en el pericarpio, para luego ser movilizada hasta la semilla. En semillas los análisis sugieren que la biosíntesis de sanguinarina se realiza de manera *in situ*, debido a que el tejido en esta etapa es posible hallar los transcritos para la producción de sanguinarina.

Aunque no abarcamos toda la gama de los genes involucrados en la biosíntesis de ABIs, el análisis de los genes en etapas comprometidas (*NCS* y *BBE*) de la biosíntesis y los genes específicos para sanguinarina (*StySyn*) y berberina (*SOMT*), nos pueden ilustrar como se puede llevar acabo el metabolismo de los ABIs durante el desarrollo del fruto y semilla. La alta abundancia de alcaloides en cápsulas de *A. mexicana* pareciera tener un parecido con el metabolismo de los alcaloides en la cápsula de *P. somniferum*, la mayor parte de las enzimas biosintéticas se encuentran en el tejido de la cápsula y, en menor medida, en el tejido del tallo y la raíz donde solo predominan las enzimas del tramo común ejemplo de ello 4'OMT 7'OMT y BBE (Labanca et al, 2018).

Semillas maduras de *A. mexicana* fueron mezcladas con solventes en condiciones acidas y alcalinas en diferentes tiempos de agitación. En nuestro ensayo, ninguno de los lavados mostró cantidades significativas en la liberación de la sanguinarina. Después de los lavados se realizó la extracción de los alcaloides de las mismas semillas empleadas; los resultados demuestran que estas semillas aun preservaban abundante sanguinarina, sugiriendo que la semilla conserva la sanguinarina en la testa durante la germinación.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

El tiempo para el desarrollo del fruto transcurre alrededor de 27 días, iniciando desde la emergencia del botón floral hasta la dehiscencia del fruto. Después de la anthesis, la cápsula aparece con una coloración verde intensa. La cápsula va aumentando su altura y ganando peso conforme transcurre el desarrollo. Cuando las cápsulas alcanzan la madurez estas presentan una decoloración en los carpelos. En la etapa de la dehiscencia los componentes del fruto (pericarpio, septum intralocular y semilla) muestran la pérdida de peso y la apertura de los carpelos relacionada con la desecación de los tejidos analizados. Por otra parte, los resultados en los análisis de los alcaloides nos demuestran que el pericarpio y el septum intralocular son tejidos que acumulan berberina durante todo el desarrollo del fruto. La semilla es un tejido capaz de acumular abundante berberina en las primeras etapas de desarrollo, sin embargo, disminuyen hasta que la testa comienza a oscurecerse, para luego predominar la sanguinarina en el estado maduro. El origen de la berberina en semillas inmaduras podría realizarse de manera *ex situ*, ya que, en esta etapa, parte de los genes correspondiente al tramo común y a la ruta específica de berberina se encuentran ausentes, sugiriendo que la berberina puede ser sintetizada en el pericarpio para luego ser movilizada hasta la semilla. El origen de la sanguinarina en semillas de estado maduro podría provenir de la síntesis *in situ*, puesto que en esta etapa se generan los transcritos del tramo común y los transcritos de la ruta específica de sanguinarina.

5.1 Modelo integrativo

Se ha generado un modelo integrativo (figura 5.1) donde se condensan los hallazgos generados en este proyecto de investigación. El modelo propone que el pericarpio de frutos inmaduros produce berberina y cuenta con la gama de genes involucrados en la producción de este alcaloide, a diferencia del septum intralocular que no contiene los genes para producir berberina, aunque acumulan este metabolito. Se sugiere que el pericarpio sintetiza la berberina distribuyéndola al septum intralocular y también a la semilla. Los frutos en la etapa madura, el pericarpio y el septum intralocular continúan acumulando berberina, sin embargo, el pericarpio no genera los elementos genéticos del tronco común para la biosíntesis de berberina. Se sugiere que el tallo contribuye con la distribución de los transcritos hacia el pericarpio, ya que datos mostrados por Vázquez-

Flota y colaboradores (2018), demuestran que el tallo es un tejido capaz de generar los transcritos necesarios para la biosíntesis de sanguinarina, berberina y querelitrina. La semilla en etapa madura, cuentan con los genes involucrados en la biosíntesis de sanguinarina, por lo que la biosíntesis de este alcaloide en la semilla madura podría ocurrir de manera *in situ*.

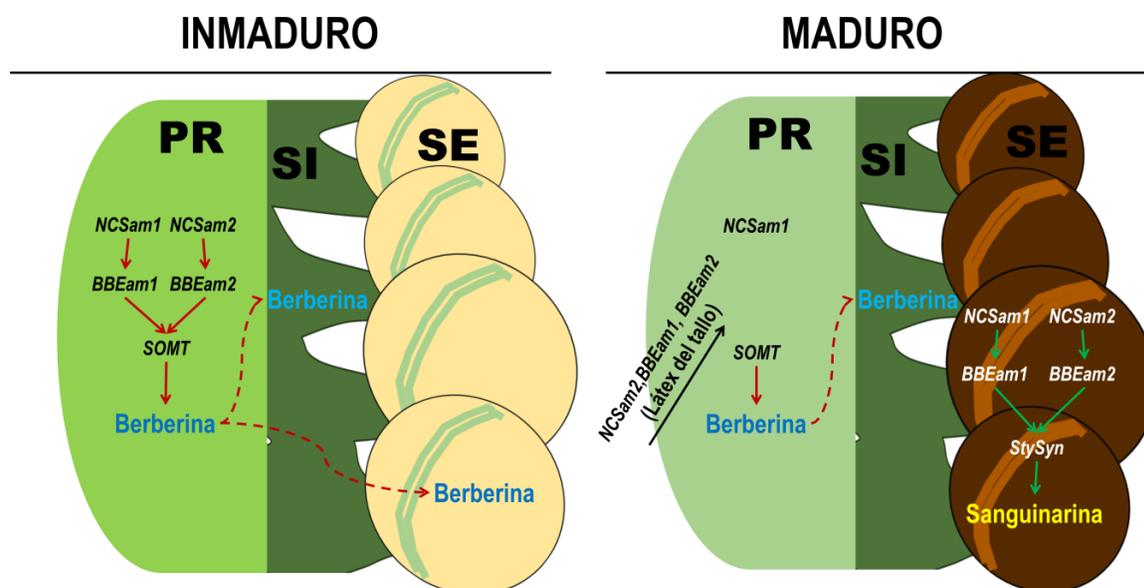


Figura 5.1 Modelo integrativo en la biosíntesis de alcaloides en frutos de *A. mexicana* en la etapa inmadura (izquierda) y en la etapa madura (derecha). El pericarpio en la etapa inmadura es capaz de producir, acumular y distribuir la berberina hacia el septum intralocular y hacia la semilla. Los frutos al llegar a la etapa madura, la sanguinarina presente en semillas se sintetiza de manera *in situ*. Se sugiere que el tallo contribuye con la distribución de los transcritos hacia el pericarpio, puesto que este tejido no genera los elementos genéticos del tronco común, a pesar de ello, el pericarpio es capaz de acumular berberina. PR= pericarpio, SI=septum intralocular, SE= semilla.

5.2 Perspectivas

El trabajo realizado en este proyecto ha contribuido mucho en la comprensión del metabolismo de los alcaloides en *A. mexicana*. Los resultados hasta el momento nos sugieren que la biosíntesis de los alcaloides puede ser un mecanismo de tráfico y acumulación altamente regulado en los diversos tejidos de la planta durante el desarrollo. En cápsulas, aún falta analizar la gama completa y la abundancia relativa de los genes,

así como las enzimas involucradas en la biosíntesis de alcaloides. Sería conveniente realizar la localización celular de los transcritos y los sitios acumulación de los alcaloides. Las inmunotécnicas son herramientas poderosas para comprender la localización específica de genes y enzimas. También es pertinente desarrollar biología integrativa generando bases de datos en los perfiles de transcripción, proteínas y de metabolitos en tejidos reproductivos para proporcionarnos una visión general en la producción de ABIs en el desarrollo de la planta y correlacionarlos con diferentes especies productoras de alcaloides. El conocimiento profundo en las vías de producción de los ABI's debería permitirnos aplicar ingeniería genética para desarrollar cultivos altamente productores de estas importantes moléculas farmacéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, N., Gupta, S., Husain, M. M., Heiskanen, K. M., & Mukhtar, H. (2000). Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clinical Cancer Research*, 6(4), 1524-1528.
- Beaudoin, G. A., & Facchini, P. J. (2014). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 240(1), 19-32.
- Bernáth J. 1998a. Utilization of poppy seed. In: Bernáth J, ed. *Poppy. The Genus Papaver*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 337–342.
- Beuria, T.K., M.K. Santra, and D. Panda, (2005) Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry*, 44, 16584-16593.
- Bird DA, Franceschi VR, Facchini PJ. 2003. A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell* 15:2626–35
- Bird, D.A., and P.J. Facchini, (2001) Berberine bridge enzyme, a key branch-point enzyme in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis, contains a vacuolar-shortening determinant. *Planta*, 213, 888-897.
- Boesewinkel, F. D., & Bouman, F. (1984). The seed: structure. In *Embryology of angiosperms* (pp. 567-610). Springer Berlin Heidelberg.
- Bosch, C. H. *Argemone mexicana* L. Record from Protabase. Schmelzer, G. H; Gurib-Fakim, A. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa), Wageningen, Netherlands. <http://database.prota.org/search.htm>. (2007).
- Brahmachari, G.; Gorai, D.; Roy, R (2013). *Argemone mexicana*: Chemical and pharmacological aspects. *Rev Bras Farmacogn*, 3: 559-575
- Chandra, P., & Todaria, N. P. (1983). Maturation and ripening of three Berberis species from different altitudes. *Scientia Horticulturae*, 19(1-2), 91-95.
- Chang, Y. C.; Chang, F. R.; Khalil, A. T.; Hsieh, P. W.; Wu, Y. C. Cytotoxic benzophenanthridine and benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. *Z. Naturforsch-C*. 2003a, 58, 521-526.
- Chávez M.L.D, Rolf M, Gesell A, Kutchan T.M. Characterization of two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P450-dependent enzymes of alkaloid formation in the Mexican prickly poppy *Argemone mexicana*. *Arch Biochem Biophys*. 2011, 507:186-193.
- Chou, H. C., Lu, Y. C., Cheng, C. S., Chen, Y. W., Lyu, P. C., Lin, C. W.,... & Chan, H. L. (2012). Proteomic and redox-proteomic analysis of berberine-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Journal of proteomics*, 75(11), 3158-3176.
- Crawford, R. (1919). Legends and Lore of the Healing Art: II. *The Lotus Magazine*, 10(1), 25-30.
- Cresson, R. A., & Schneider, E. L. (1988). Ovule and seed structure in *Argemone aurantiaca* (Papaveraceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 108-112.

- De Luca V, Balsevich J, Tyler RT, Eilert U, Panchuk BD, Kurz WGW. 1986. Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. *J. Plant Physiol.* 125:147–56
- De-La-Cruz Chacón, I., González-Esquinca, A. R., & Riley-Saldaña, C. A. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas scientiarum*, 17(2).
- Ezelarab, G. E., Dormer, KJ. 1966. The organization of the primary vascular system in the Rhoadales. *Ann. Bot. II.* 30: 123-132.
- Facchini PJ, Bird DA. 1998. Developmental regulation of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy plants and tissue cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34:69–79
- Facchini PJ, De Luca V. 1994. Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in opium poppy. *J. Biol. Chem.* 269:26684–90
- Facchini PJ, De Luca V. 1995. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell* 7:1811–21
- Facchini PJ, Johnson AG, Poupart J, De Luca V. 1996. Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiol.* 111:687–97
- Facchini, P.J., (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 29-66.
- Facchini, P.J., and V. De Luca (2008) Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal*, 54, 763-784.
- Frenzel, T., & Zenk, M. H. (1990). S-Adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine-4'-O-methyl transferase, a regio- and stereoselective enzyme of the (S)-reticuline pathway. *Phytochemistry*, 29(11), 3505-3511.
- Fujiwara H, Takeshita N, Terano Y, Fitch JH, Tsujita T, et al. 1993. Expression of (S)-scoulerine-9-O-methyltransferase in *Coptis japonica* plants. *Phytochemistry* 34:949–54
- Fukuda H. 2004. Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 379–391.
- García, V., F. Valdés, R. Martín, J. C. Luis, A. M. Afonso, and J. H. Ayal (2006) Biosynthesis of Antitumoral and Bactericidal Sanguinarine. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 12, 1-6
- Grey-Wilson C. 2000. Poppies. The Poppy Family in the Wild and in Cultivation. Oregon: Timber Press.
- Guízar-González, C., Trujillo-Villanueva, K., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2012). Sanguinarine and dihydrosanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* (L) Cell suspension cultures exposed to yeast extract. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(1), 19-22.

- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzyloquinoline alkaloid metabolism—a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, pct020.
- Hagel, J.M.; Facchini, P.J (2013). Benzyloquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant cell Physiol.* 54:647-672.
- Hartmann T, Dierich B. 1998. Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta* 206:443–51
- Hashimoto T, Hayashi A, Amano Y, Kohno J, Iwanari H, et al. 1991. Hyoscyamine 6 β -hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. *J. Biol. Chem.* 266:4648–53
- Jorgensen RA, Atkinson RG, Forster RL, Lucas WJ. 1998. An RNA-based information superhighway in plants. *Science* 279:1486–87
- Kapoor LD. 1973. Constitution of amphicribal vascular bundles in capsule of *Papaver somniferum* Linn. *Botanical Gazette* 134, 161–165.
- Kidwai, P. 1972. Development of stomata in some Papaveraceae and Fumaria. *Ann. Bot.* II. 36: 1011-1018.
- Koshiro, Y., Zheng, X. Q., Wang, M. L., Nagai, C., & Ashihara, H. (2006). Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. *Plant Science*, 171(2), 242-250.
- Kourmpetli, S., & Drea, S. (2014). The fruit, the whole fruit, and everything about the fruit. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4491-4503.
- Krug, E., & Proksch, P. (1993). Influence of dietary alkaloids on survival and growth of *Spodoptera littoralis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(8), 749-756.
- Labanca, F., Ovesnà, J., & Milella, L. (2018). *Papaver somniferum* L. taxonomy, uses and new insight in poppy alkaloid pathways. *Phytochemistry Reviews*, 1-19.
- Liscombe DK, MacLeod BP, Loukanina N, Nandi OI, Facchini PJ. 2005. Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* 66:2501–20
- Liscombe, D. K., & Facchini, P. J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 173-180.
- Lozoya, X. (1999). Un paraíso de plantas medicinales. *Arqueología mexicana*, 7(39), 14-21.
- Lozoya, X., y M. Lozoya, (1982) Flora medicinal de México. Plantas indígenas. Primera parte. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F; México. IMSS. pp. 148-173.
- Marh Susan (2017). Breadseed or opium poppy, *Papaver somniferum*. Wisconsin, E.U.: Master Gardener Program. Recuperado de <https://wimastergardener.org/article/breadseed-or-opium-poppy-papaver-somniferum/>
- Martínez, M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 1979.

- Miraldi, E., Masti, A., Ferri, S., & Comparini, I. B. (2001). Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 72(6), 644-648.
- Monforte-Gonzales, Guizar Monforte-González, M.; Guízar-González, C.; Rubio-Piña, J.; Carrillo-Pech, M.; Vázquez-Flota, F (2012). Berberine and Sanguinarine Quantitation in *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) Tissues by TLC–In Situ Fluorography. *J Planar Chromatogr.* 4:358-360.
- Osho, A.; Adetunji, T. Antimicrobial activity of the essential oil of *Argemone Mexicana* Linn. *J Med Plants Res.* 2010, 4:19-22.
- Park, I. K., Lee, H. S., Lee, S. G., Park, J. D., & Ahn, Y. J. (2000). Antifeeding activity of isoquinoline alkaloids identified in *Coptis japonica* roots against *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) and *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Galerucinae). *Journal of Economic Entomology*, 93(2), 331-335.
- Pauli, H. H., & Kutchan, T. M. (1998). Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S) -N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*, 13(6), 793-801.
- Pitty, A.; Muñoz, R. Guía práctica para el manejo de la maleza. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras. 1993.
- Rajvaidhya, S., Nagori, B. P., Singh, G. K., Dubey, B. K., Desai, P., & Jain, S. (2012). A review on *Argemone mexicana* Linn. Indian medicinal plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(8), 2494.
- Riley-Saldaña, C. A., González-Esquinca, A. R., & Chacón, I. D. L. C. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum*, 17(2), 189-202.
- Roberts, M. F. (Ed.). (2013). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media.
- Roberts, M.F., and M. Wink, (1998) *Alkaloids biochemistry, ecology and medicinal applications*. Plenum Press. New York. pp. 452-456.
- Rubio Piña, J.A. (2009) Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Tesis de doctorado. Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida Yucatán, México.
- Rubio-Piña, J.; Vázquez-Flota, F.A. (2013), Pharmaceutical Applications of the Benzyloisoquinoline Alkaloids from *Argemone mexicana* L. *Curr Top Med Chem.* 2013, 13:2200-2207.
- Samanani N, Park SU, Facchini PJ. 2005. Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell* 17:915–26.

- Sánchez-Mendoza, M.E., C. Castillo-Henkel, and A. Navarrete (2008) Relaxant action mechanism of berberina identified as the active principle of *Argemoneochro/euca* Sweet in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Journal of pharmacy and Pharmacology*, 60, 229-236.
- Sato, F., Tsujita, T., Katagiri, Y., Yoshida, S., & Yamada, Y. (1994). Purification and Characterization of S-adenosyl-l-methionine: norcoclaurine 6-O-Methyltransferase from Cultured *Coptis japonica* Cells. *The FEBS Journal*, 225(1), 125-131.
- Schmeller, T., B. Latz-Brüning and M. Wink, (1997) Biochemical activities of berberine, palmitine and sanguinarine mediating chemical defense against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*, 44, 257-266.
- Sellier, M. J., Reeb, P., & Marion-Poll, F. (2011). Consumption of bitter alkaloids in *Drosophila melanogaster* in multiple-choice test conditions. *Chemical Senses*, 36(4), 323-334.
- Sertürner, F. W. (1806). Darstellung der reinen Mohnsäure (Opiumsäure) nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neu entdeckten Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen. *Journal der Pharmacie fuer Aerzte und Apotheker*, 14, 47-93.
- Shields, V. D., Smith, K. P., Arnold, N. S., Gordon, I. M., Shaw, T. E., & Waranch, D. (2008). The effect of varying alkaloid concentrations on the feeding behavior of gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (L.)(Lepidoptera: Lymantriidae). *Arthropod-Plant Interactions*, 2(2), 101-107.
- Soman, P., & Bhargava, M. (1980). Histochemical studies on the female gametophyte of *Argemone mexicana* L. *Cytologia*, 45(1-2), 281-291.
- Srimany, A., George, C., Naik, H. R., Pinto, D. G., Chandrakumar, N., & Pradeep, T. (2016). Developmental patterning and segregation of alkaloids in areca nut (seed of *Areca catechu*) revealed by magnetic resonance and mass spectrometry imaging. *Phytochemistry*, 125, 35-42.
- Steffens P, Nagakura N, Zenk MH. 1985. Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* cell cultures. *Phytochemistry* 24:2577–83
- St-Pierre B, Vazquez-Flota FA, De Luca V. 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell* 11:887–900
- Suzuki K, Yun DJ, Chen XY, Yamada Y, Hashimoto T. 1999. An *Atropa belladonna* hyoscyamine 6β-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. *Plant Mol. Biol.* 40:141–52
- Tamado, T., & Milberg, P. (2000). Weed flora in arable fields of eastern Ethiopia with emphasis on the occurrence of *Parthenium hysterophorus*. *Weed Research*, 40(6), 507-521.
- Villinski, J.R., E.R. Dumas, H.B. Chai, J.M. Pezzuto, C.K. Angerhofer, and S. Gafner, (2003) Antibacterial activity and alkaloid content of *Berberis thunbergii*, *Berberis vulgaris* and *Hydrastis canadensis*. *Pharmaceutical Biology*, 41, 551-557.

- Weid M, Ziegler J, Kutchan TM. 2004. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:13957–62
- Wink, M., T. Schmeller, and B. Latz-Bruning (1998) Modes of action of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 1181-1937.
- Xool-Tamayo, J. F., Monforte-González, M., Rubio-Piña, J., Mirón-López, G., & Vázquez-Flota, F. (2016). Early developmental onset of alkaloid biosynthesis in Mexican poppy (*Argemone mexicana* L) Papaveraceae. *Phytochemistry Letters*.
- Zhang, L., Li, J., Ma, F., Yao, S., Li, N., Wang, J., & Yao, Q. (2012). Synthesis and cytotoxicity evaluation of 13-n-alkyl berberine and palmatine analogues as anticancer agents. *Molecules*, 17(10), 11294-11302.
- Ziegler, J., & Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 735-769.