



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ORIGEN BIOSINTÉTICO DE TERPENOIDES EN
*PENTALINON ANDRIEUXII***

Tesis que presenta

MICKEL RANDOLPH HIEBERT GIESBRECHT

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2020

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 **Mickel Randolph Hiebert Giesbrecht**, titulado “**Origen biosintético de terpenoides en *Pentalinon andrieuxii***”, fue realizado bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, en el Laboratorio de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología, en la línea de Biotecnología de Productos Naturales, y del Dr. Gregorio Godoy Hernández, de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Doctorado del Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 30 de junio de 2020.

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 regirán 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.

Firma:  _____

Nombre: Mickel Randolph Hiebert Giesbrecht

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Estudio del origen biosintético de terpenoides con esqueleto campechano producidos por *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae)” (CB2013/223404) en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y del Dr. Gregorio del Carmen Godoy Hernández.

AGRADECIMIENTOS

Al CICY, por haberme abierto las puertas, en especial al Laboratorio de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología.

A CONACYT, por la beca de doctorado No. 297661, por la beca mixta de movilidad al extranjero 2016-2017 No. 291062 y por el financiamiento del proyecto de Ciencia Básica CB2013/223404 que permitió la realización de esta tesis.

A la Facultad de Química de la Universidad Técnica de Munich, en particular al Dr. Wolfgang Eisenreich, por abrirme las puertas de su laboratorio, pero sobre todo por su amabilidad y paciencia.

A The Metabolomics Innovation Center de la Universidad de Alberta, en particular al Dr. David Wishart, gracias a su apoyo pude aprender de los mejores y ampliar las fronteras de mi conocimiento.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, por recibirme en su grupo de investigación, ser la guía en mi formación profesional y por ir más allá de sus obligaciones de asesor para ayudarme a alcanzar mis objetivos.

Al Dr. Gregorio Godoy Hernández, por su apoyo y consejo.

A la QBB. Karlina García Sosa y M. en E. Fabiola Escalante Erosa, por haber sido el verdadero apoyo técnico en el laboratorio en el día a día.

DEDICATORIAS

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, por el constante apoyo.

A Claudia y Arturo, esta aventura recién empieza.

Mama und Papa, ohne euch wäre nichts möglich.

A Javier y Euge, hicieron más de lo que debieron y estas páginas no alcanzan para agradecerlo.

A mi familia en Paraguay, Canadá y México, ustedes son la base de todo.

A mis amigos y compañeros, dentro y fuera del laboratorio.

RESUMEN

Desde el aislamiento de los urechitoles A y B a partir del extracto metanólico de la raíz de *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) B.F. Hansen & Wunderlin (Apocynaceae) ha existido un creciente interés en establecer su origen biosintético. Estos tri-nor-sesquiterpenoides poseen una estructura química inusual y un esqueleto carbonado novedoso e inédito. Su inusual estructura hace que, hasta el momento, no haya sido posible establecer su origen biosintético por simple asociación con otros grupos de metabolitos secundarios conocidos. En estudios previos, dirigidos a establecer su origen biosintético, se ha planteado el uso de $^{13}\text{CO}_2$ como precursor marcado en experimentos de pulso/acumulación, aunque no fueron exitosos en lograr el marcaje con ^{13}C del urechitol A. El $^{13}\text{CO}_2$ permite el marcaje universal de un gran número de metabolitos, lo cual resulta de especial utilidad cuando el origen biosintético del metabolito de interés es desconocido. En un estudio más reciente fue posible establecer la distribución espacio-temporal de urechitol A en *P. andrieuxii*, lo cual permitió el diseño de nuevas estrategias de pulso/acumulación para lograr el marcaje de urechitol A.

En este trabajo fue posible marcar el urechitol A con ^{13}C , por primera vez. Si bien, las cantidades de urechitol A marcado y puro obtenidas fueron insuficientes para realizar análisis de resonancia magnética nuclear avanzados, fue posible analizar la distribución isotopomérica de urechitol A por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, identificándose isotopómeros característicos de la vía del 3-metil-eritritol-fosfato (MEP).

Adicionalmente, se identificaron líneas transgénicas de *P. andrieuxii* con una mayor capacidad de producción de terpenos, en particular, del ácido betulínico y de urechitol A. Las condiciones de marcaje isotópico establecidas aquí y las líneas transgénicas identificadas serán de gran utilidad para futuros estudios que permitan obtener una cantidad suficiente de urechitol A marcado y finalmente establecer su origen biosintético.

ABSTRACT

Since the isolation of the urechitols A and B from the methanolic extract of the roots of *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) B. F. Hansen & Wunderlin (Apocynaceae), there has been a growing interest in establishing their biosynthetic origin. These trinorsesquiterpenoids possess an unusual chemical structure and a novel carbon skeleton. Due to its unusual structure, it has not yet been possible to establish its biosynthetic origin by simple association with other groups of known secondary metabolites.

In previous studies, aimed at establishing its biosynthetic origin, $^{13}\text{CO}_2$ has been used as a marked precursor in pulse/chase experiments, however these experiments were not successful in achieving the ^{13}C labeling of urechitol A. $^{13}\text{CO}_2$ allows to universally label a large number of metabolites through a single experiment, which is especially useful when the biosynthetic origin of the metabolite of interest is unknown. In a more recent study, it was possible to establish the spatio-temporal distribution of urechitol A in *P. andrieuxii*, which allowed to design new pulse/chase strategies to achieve the labeling of urechitol A.

In this work the ^{13}C labeling of urechitol A was achieved for the first time. Although the obtained quantities of pure labeled urechitol A were insufficient to perform advanced nuclear magnetic resonance analyses, it was possible to analyze the isotopomeric distribution of urechitol A by gas chromatography coupled to mass spectrometry, identifying characteristic isotopomers of the MEP pathway.

In addition, *P. andrieuxii* transgenic lines were identified with an increased capacity for terpene production, in particular, betulinic acid and urechitol A. The conditions of isotopic labeling established here and the identified transgenic lines will be very useful for future studies to obtain sufficient amounts of labeled urechitol A to finally establish its biosynthetic origin.

Índice

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Abstract	iii
Introducción	1
Capítulo I	
ANTECEDENTES.....	4
1.1. Los precursores globales de los terpenos: Isopentenil pirofosfato (IPP) y Dimetil alil pirofosfato (DMAPP).....	5
1.2. Sesquiterpenos.....	7
1.3. Guaianos	8
1.4. Guaianólidos.....	9
1.5. Trinorguaianos	10
1.6. Terpenos en <i>Pentalinon andrieuxii</i>	11
1.7. Estrategias para el estudio biosintético de metabolitos secundarios	12
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
Capítulo II	
Marcaje de Urechitol A y Ácido Betulínico Por Experimentos de Pulso-Acumulación con ¹³ CO ₂ y Análisis Isotópico.....	
2.1. INTRODUCCIÓN	18
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.2.1. Germinación de semillas y cultivo de <i>P. andrieuxii</i>	23
2.2.2. Experimentos de pulso/acumulación con ¹³ CO ₂ en plantas de <i>P. andrieuxii</i> ..	24
2.2.3. Obtención de fracciones diclorometánicas a partir de las raíces de <i>P. andrieuxii</i>	24
2.2.4. Purificación de ácido betulínico marcado con ¹³ C a partir de la fracción diclorometánica de hojas (LP-27) y análisis por CG-EM y RMN.	26
2.2.4.1. Purificación de ácido betulínico.....	26
2.2.4.1.1. Cromatografía líquida al vacío de LP-27	26
2.2.4.1.2 Cromatografía en columna de gravedad de PAR-4D	26
2.2.4.2. Análisis por GC-EM de ácido betulínico marcado con ¹³ C (BTA)	27
2.2.5. Purificación y análisis de urechitol A marcado con ¹³ C	27
2.2.5.1. Purificación de urechitol A marcado con ¹³ C a partir de fracciones de extractos de raíces de <i>P. andrieuxii</i>	27
2.2.5.2. Análisis por CG-EM de urechitol A puro y en fracciones diclorometánicas.....	28
2.2.5.3. Análisis de enriquecimiento de ¹³ C por CG-EM en muestras puras o enriquecidas en urechitol A	28
2.2.5.4. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de urechitol A y ácido betulínico marcado con ¹³ C	29
2.2.6. Extracción y análisis de glucosa y de aminoácidos a partir de hojas, tallos y raíces de plantas de <i>P. andrieuxii</i> tratadas con ¹³ CO ₂	29
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
2.4. CONCLUSIONES.....	40

Capítulo III	
La Transformación Genética de la Enredadera Tropical <i>Pentalinon andrieuxii</i> (Apocynaceae) Via <i>Agrobacterium rhizogenes</i> Produce Plantas con una Mayor Capacidad de Producción de Terpenoides.....	42
3.1. INTRODUCCIÓN	42
3.2. GENETIC TRANSFORMATION OF THE TROPICAL VINE <i>Pentalinon andrieuxii</i> (APOCYNACEAE) VIA <i>Agrobacterium rhizogenes</i> PRODUCES PLANTS WITH AN INCREASED CAPACITY OF TERPENOID PRODUCTION.....	44
3.2.1. INTRODUCTION	44
3.2.2. MATERIALS AND METHODS.....	46
3.2.2.1. Plant material	46
3.2.2.2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> strain and genetic transformation	46
3.2.2.3. <i>Regeneration of transformed plants and adaptation to ex-vitro conditions</i>	47
3.2.2.4. Genomic DNA extraction and PCR amplification of genes rolA, rolB and rolC	47
3.2.2.5. Extraction of plant material	48
3.2.2.6. Chromatographic analyses.....	48
3.2.2.6.1. Sample preparation	48
3.2.2.6.2. Detection of urechitol A in chromatographic profiles.....	49
3.2.2.6.3. Quantification of urechitol A by GC-FID.	49
3.2.2.6.4. Detection and quantification of betulinic acid in HPLC-UV (Figure 3.5) chromatographic profiles.	50
3.2.2.7. Statistical analyses.....	50
3.2.3. RESULTS AND DISCUSSION	51
3.2.4. SUPPLEMENTARY MATERIAL	57
Capítulo IV	
4.1. DISCUSIÓN GENERAL	60
4.2. CONCLUSIONES.....	63
4.3. PERSPECTIVAS	64
Bibliografía.....	65

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema biosintético del origen de los terpenoides (Dewick, 2009)	4
Figura 1.2. Distribución de las vías MVA y MEP en la naturaleza (Eisenreich <i>et al.</i> , 2001) ..	5
Figura 1.3. Orígenes biosintéticos del IPP y del DMAPP (Peña-Rodríguez <i>et al.</i> , 2014) ..	6
Figura 1.4. Reacciones de ciclación del FPP que dan lugar a algunos grupos de sesquiterpenos (Dewick, 2009).....	8
Figura 1.5. Esquema de biosíntesis del guaianólido thapsigargina. I) Germacrene B sintasa, II) y III) enzimas similares al citocromo P450, IV) y V) enzimas desconocidas (Simonsen <i>et al.</i> , 2013).....	10
Figura 1.6. Biosíntesis de la geosmina en la myxobacteria <i>Myxococcus xanthus</i> . (Dickschat <i>et al.</i> , 2005).	11
Figura 1.7. Estructura química del esqueleto de guaiano (a), esqueleto de trinorguaiano (b), esqueleto de campechano (c) y urechitol A (d).	12
Figura 2.1. Esquema simplificado de la biosíntesis de los derivados del campechano a partir del difosfato de farnesilo.	19
Figura 2.2. Estructura química de trinorsesquiterpenos bicíclicos. *Posición en la cual se perdió un grupo isopropilo.....	20
Figura 2.3. Propuesta de ruta biosintética del urechitol A.	21
Figura 2.4. Distribución de isotopólogos de urechitol A de acuerdo al origen biosintético de los precursores IPP y DMAPP. Las líneas indican pares de ^{13}C , los triángulos indican marcas individuales de ^{13}C . En la vía MEP las flechas representan unidades M+3 con un acoplamiento a larga distancia.....	23
Figura 2.5. Esquema de distribución de experimentos en periodos de pulso/acumulación.....	25
Figura 2.6. Niveles de enriquecimiento de ^{13}C de glucosa en raíces, tallos y hojas de PAT-15, planta control expuesta a un periodo de pulso corto (12 horas) y un periodo de acumulación medio (7 días).	31
Figura 2.7. Niveles de enriquecimiento de distintos aminoácidos para las raíces, tallos y hojas de la muestra PAT-15.	32
Figura 2.8. Enriquecimiento absoluto de ^{13}C en urechitol A, medido en fracciones diclorometánicas, luego de experimentos de pulso/acumulación con $^{13}\text{CO}_2$. Los datos fueron agrupados de acuerdo al tiempo de pulso con $^{13}\text{CO}_2$, definiéndose como pulso largo a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 16 horas y como pulso corto a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 12 horas.....	33
Figura 2.9. Enriquecimiento absoluto de ^{13}C en urechitol A en muestras semipuras, luego de experimentos de pulso/acumulación con $^{13}\text{CO}_2$. Los datos fueron agrupados de acuerdo al tiempo de pulso con $^{13}\text{CO}_2$, definiéndose como pulso largo a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 16 horas y como pulso corto a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 12 horas.	34
Figura 2.10. Distribución isotopológica del ácido betulínico y del acetato de lupeol (adaptado de Peña-Rodríguez <i>et al.</i> , 2014)	37
Figura 2.11. Distribución de isotopólogos de urechitol A. Los datos fueron agrupados de acuerdo al tiempo de pulso con $^{13}\text{CO}_2$, definiéndose como pulso largo a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 16 horas y como pulso corto a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 12 horas.	38
Figura 2.12. Estructura del ácido betulínico y señales selectas de su espectro de ^{13}C -RMN. Las líneas verdes indican los pares C-C cuyos acoplamientos fue posible observar en el espectro de ^{13}C -RMN.	39
Figura 2.13. Espectro de ^{13}C -RMN de urechitol A semipuro. Las señales etiquetadas corresponden a señales debidas al urechitol A.	40

Figura 3.1. Chemical structures of betulinic acid and urechitol A.	45
Figura 3.2. Different stages of <i>P. andrieuxii</i> plant regeneration. (A) <i>P. andrieuxii</i> hairy root culture; (B) spontaneous shoot development on hairy root cultures; (C) <i>P. andrieuxii</i> regenerated plantlet rooted <i>in vitro</i> ; (D) acclimatation of <i>in vitro</i> plants to <i>ex vitro</i> conditions; (E) transformed <i>P. andrieuxii</i> plants compared to the wild type control plant.	52
Figura 3.3. Content of betulinic acid in leaves (A) and urechitol A in roots (B) of transformed <i>P. andrieuxii</i> plants. Bars represent mean values \pm SD. Different letters indicate statistical significant differences.	53
Figura 3.4. Increase of betulinic acid and urechitol A represented as fold increases measured for betulinic acid and urechitol A in relation to the wild type control (A) and relative fold increases of betulinic acid in relation to urechitol A (B) . Fold increases were calculated using the equation " <i>Content of analyte (transgenic lines)/ Content of analyte (Wt control)</i> ". Relative fold increases were calculated using the equation " <i>(Fold increase of betulinic acid – Fold increase of urechitol A)/Fold increase of betulinic acid</i> ".	55
Figura 3.5. GC chromatogram of pure urechitol A (A) . HPLC chromatogram of pure betulinic acid (B)	58
Figura 3.6. PCR amplification products for genes <i>rolA</i> , <i>rolB</i> and <i>rolC</i> . Lanes 1-14 represent the regenerated plant lines, lane 15 represents the untransformed <i>Wt</i> control plant, lane 16 represents the positive control (isolated <i>Agrobacterium rhizogenes Ri</i> plasmid) and NTC represents the blank sample with no DNA added to the reaction mixture.	59

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1. Sequences of the primers used for PCR amplification of <i>Rol</i> genes.....	57
--	----

INTRODUCCIÓN

La producción de metabolitos secundarios constituye el mecanismo a través del cual las plantas interactúan con su entorno. Estos metabolitos cumplen diversas funciones que incluyen la defensa de la planta contra patógenos, la atracción de polinizadores, la repulsión de herbívoros, la protección contra la radiación ultravioleta del sol y la inhibición del crecimiento de potenciales plantas competidoras. Los metabolitos secundarios, por tanto, confieren a la planta características que le permiten sobrevivir a condiciones adversas, otorgándole una ventaja evolutiva sobre otros individuos sometidos a las mismas condiciones de selección (Dewick, 2009; Haslam, 1986; Williams *et al.*, 1989).

Los diversos usos que la humanidad ha dado a las plantas son atribuidos en gran medida a las propiedades biológicas de sus metabolitos secundarios, especialmente en el uso de plantas con fines medicinales y cosméticos, para la producción de aromas, de agroquímicos, en aplicaciones industriales y en la gastronomía, lo que en conjunto las ha convertido en objeto de interés para la química, la farmacia y la medicina modernas (Aburjai y Natsheh, 2003; Butler, 2004; Phillipson, 2001).

El aislamiento de la morfina en 1806 por Friederich Wilhelm Sertürner fue la primera evidencia de que aislar el principio activo de una planta con actividad biológica es posible y que esta actividad puede ser atribuida a un compuesto químicamente definido (Krishnamurti y Rao, 2016; Schmitz, 1985; Sertürner, 1817). El entusiasmo científico generado por este descubrimiento dio lugar a un aumento en el número de productos naturales bioactivos aislados y la velocidad a la cual se desarrolló este campo tuvo una fuerte influencia en áreas como la química orgánica, la química analítica, la industria farmacéutica y la química en general (Hartmann, 2007).

Desde el aislamiento de la morfina y durante la primera mitad del siglo XX, el mundo científico estuvo principalmente enfocado en el aislamiento de nuevas moléculas de origen natural y su elucidación estructural. El aumento del poder resolutivo de las metodologías analíticas (cromatográficas y espectrométricas) y la disponibilidad de isótopos radioactivos a partir de la década de 1950, permitió iniciar estudios de biosíntesis y del metabolismo vegetal, debido a lo cual en la actualidad existe un amplio conocimiento sobre las vías metabólicas responsables de la generación de estas moléculas (Bourgaud *et al.*, 2001; Hartmann, 2007).

La producción de metabolitos secundarios no es un proceso uniforme y continuo a lo largo de la vida de una planta. Se encuentra influenciada por factores internos como la ontogenia o la fenología y en otros casos la activación de las vías biosintéticas depende de factores ambientales como la exposición a patógenos, el estrés abiótico y las condiciones climáticas. Además, la producción y el almacenamiento de los metabolitos secundarios no ocurre necesariamente en un mismo órgano vegetal, por lo que la presencia de metabolitos secundarios está también influenciada por los mecanismos de transporte a los diferentes tejidos del organismo (Brown *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 1998; Mert-Turk *et al.*, 2003).

Pentalinon andrieuxii Müll. Arg. (Apocynaceae) es una planta nativa de la península de Yucatán. Es una enredadera distribuida desde el centro de México hasta Nicaragua (Morales, 2009). Es utilizada en la medicina tradicional maya para el tratamiento de diferentes afecciones como mordeduras de serpientes, problemas nerviosos y las lesiones causadas por la leishmaniasis cutánea (Pulido y Serralta, 1993). En la búsqueda de los metabolitos responsables de la actividad antiprotozoaria de los extractos de la raíz de *P. andrieuxii* se han aislado e identificado esteroides, cumarinas y triterpenoides con actividad leishmanicida (Pan *et al.*, 2012); adicionalmente, se han aislado dos derivados de pregnano de esta especie (Yam-Puc *et al.*, 2012) y se ha reportado la presencia de ácido betulínico (Domínguez-Carmona *et al.*, 2010) con actividad sobre *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma cruzi* (Duker-Eshun *et al.*, 2004; Ziegler *et al.*, 2004). Por último, a partir de extractos de la raíz, se ha reportado la identificación de dos metabolitos sin actividad biológica conocida hasta el momento, pero de inusual e inédita estructura química, designados con los nombres de urechitoles A y B (Yam-Puc *et al.*, 2009).

A pesar de que el conocimiento fitoquímico respecto a *P. andrieuxii* ha crecido de manera considerable en los últimos años, poco se sabe acerca de la biosíntesis de sus metabolitos secundarios, en particular de urechitol A y los derivados con esqueleto campechano. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es establecer el origen biosintético de esta nueva familia de metabolitos secundarios.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

Los terpenos constituyen el grupo de metabolitos secundarios más diverso de la naturaleza, con aproximadamente 36,000 miembros reportados en el reino vegetal, un número que se estima crece a razón de 1,000 miembros al año (Ashour *et al.*, 2010; Croteau *et al.*, 2000). Esta gran diversidad es notable, especialmente tomando en cuenta que se origina a partir de dos simples unidades de cinco átomos de carbonos, el isopentenil pirofosfato (IPP) y el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Figura 1.1). Estos dos bloques estructurales se unen en diferente número y sufren modificaciones como ciclizaciones y oxidaciones a través de reacciones enzimáticas para producir la gran diversidad de isoprenoides, que se clasifican de acuerdo al número de unidades básicas que los constituyen (Dewick, 2009; McGarvey y Croteau, 1995).

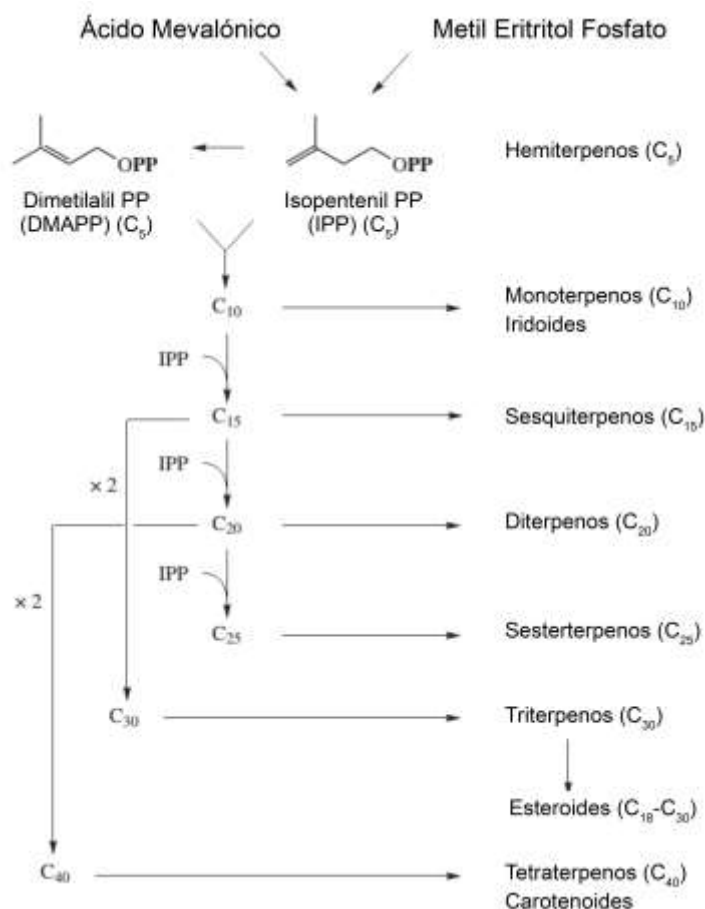


Figura 1.1. Esquema biosintético del origen de los terpenoides (Dewick, 2009).

Los isoprenoides pueden ser acíclicos, monocíclicos y policíclicos (Dewick, 2009), y esta diversidad estructural les confiere roles biológicos muy diversos en funciones como la fotosíntesis (carotenoides, clorofilas, plastoquinonas), la respiración (ubiquinona), desarrollo animal (esteroides), desarrollo vegetal (giberelinas, ácido abscísico, brasinoesteroides, estrigolactonas), defensa y polinización (Mithöfer y Boland, 2012; Phillips *et al.*, 2006).

1.1. Los precursores globales de los terpenos: Isopentenil pirofosfato (IPP) y Dimetil alil pirofosfato (DMAPP)

La vía del ácido mevalónico (MVA) o mevalonato fue, por mucho tiempo, considerada la única vía biosintética de los precursores IPP y DMAPP en los seres vivos. Sin embargo, discrepancias en los niveles de incorporación de marcas isotópicas y la aparición de átomos de carbono marcados de manera inesperada en experimentos de marcaje isotópico con organismos vivos, obligaron a proponer una vía biosintética alterna, la vía del metil-eritritol-fosfato (MEP) o desoxixilulosa (Eisenreich *et al.*, 2001).

Estudios posteriores permitieron corroborar que la vía MEP se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Eisenreich *et al.*, 2001) (Figura 1.2).

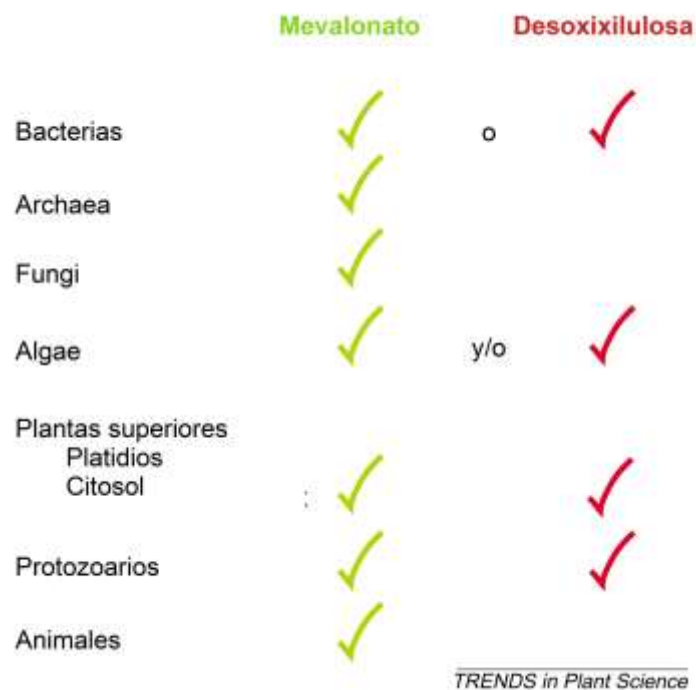


Figura 1.2. Distribución de las vías MVA y MEP en la naturaleza (Eisenreich *et al.*, 2001).

La vía MVA (Figura 1.3) inicia a partir de la condensación de tres moléculas de acetil-coenzima A por la acción de tres enzimas para producir ácido mevalónico, primer intermediario comprometido de esta vía y del cual deriva el nombre de la misma. El ácido mevalónico es posteriormente convertido a IPP a través de tres enzimas adicionales y finalmente, la enzima IPP isomerasa (IDI) genera DMAPP por medio de la isomerización del doble enlace (Rohmer, 1999).

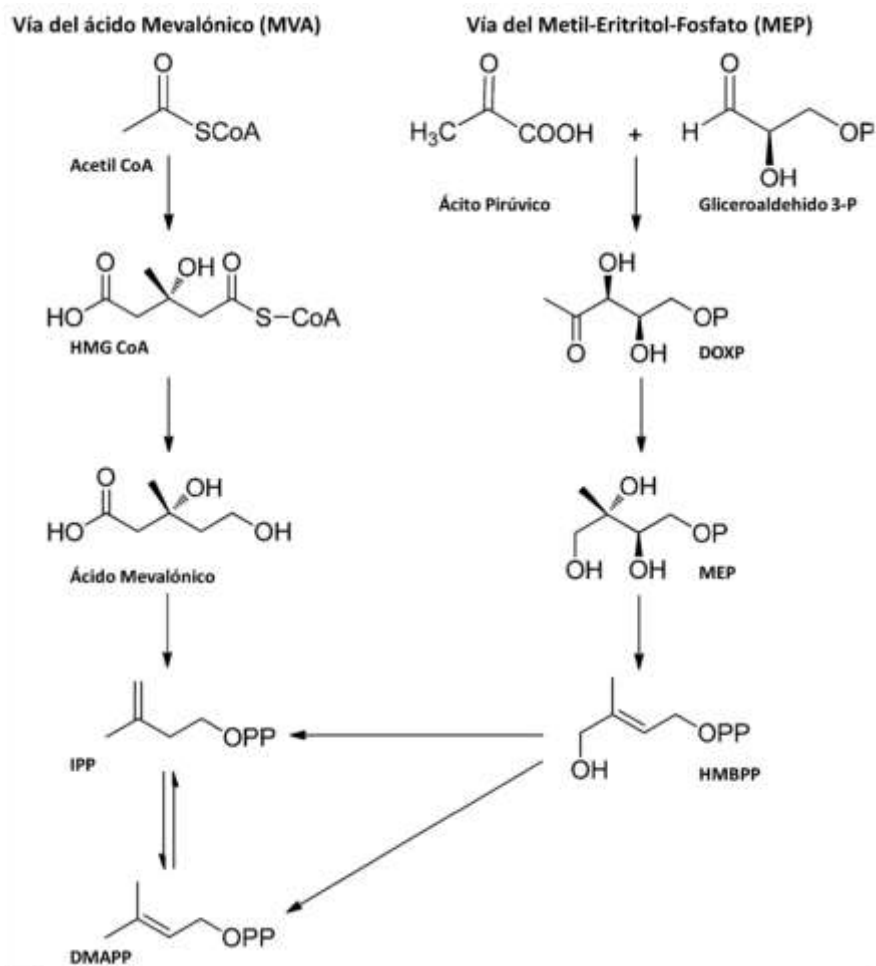


Figura 1.3. Orígenes biosintéticos de IPP y DMAPP (Peña-Rodríguez *et al.*, 2014).

La universalidad de la vía MVA ya se había puesto en duda en los años 50's. Experimentos de marcaje isotópico utilizando acetato o mevalonato como precursores mostraban una muy baja o nula incorporación de las marcas isotópicas en carotenoides, monoterpenos y diterpenos. Mientras que, por el contrario, la incorporación era muy eficiente para el caso de esteroides, triterpenoides y sesquiterpenoides. Además, en estudios utilizando la mevinolina, un potente inhibidor de la hidroximetilglutaril coenzima A

reductasa (HMGR), una enzima clave en la vía MVA, no se observaron cambios significativos en la biosíntesis de los carotenoides o del diterpeno fitol, presentes en los cloroplastos. Adicionalmente, no se observó incorporación de ácido mevalónico ni pudieron ser identificadas las enzimas responsables de la vía MVA en fracciones de cloroplastos aislados, pero sí se observó una incorporación significativa de IPP en esas mismas fracciones (Rohmer, 1999). Esta evidencia sugirió la existencia de una vía alterna a la MVA para la biosíntesis de algunos terpenos, la cual fue posteriormente identificada en bacterias, plantas superiores y otros organismos (Eisenreich *et al.*, 2001).

El primer paso de la vía MEP (Figura 1.3) implica la condensación del ácido pirúvico y el gliceraldehido-3-fosfato. Esta reacción es catalizada por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, produciendo 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) (Figura 1.3). DOXP es posteriormente convertido a 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) por medio de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reducto isomerasa (DXR) (Dewick, 2009). En los siguientes pasos biosintéticos MEP es transformado en 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP) por la acción de las enzimas 4 difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4-fosfato sintasa (CMS), 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 4 fosfato cinasa (CMK), 2C-metil-D-eritritol 2-4 difosfato sintasa (MCS) y 2C-metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa (HDS). Finalmente, la enzima 1-hidroxi-2-metil-butenil-4-difosfato reductasa cataliza la deshidratación de HMBPP a IPP y DMAPP, precursores universales de los terpenoides (Gräwert *et al.*, 2011).

1.2. Sesquiterpenos

Un importante grupo de la familia de los terpenos son los sesquiterpenos. Los sesquiterpenos se originan a partir del precursor lineal farnesil pirofosfato (FPP) que, a su vez, está constituido por tres unidades isoprenoides unidas cabeza-cola. Es a partir del FPP y a través de una gran variedad de reacciones de ciclación y rearrreglo que se origina una amplia diversidad de sesquiterpenos (Figura 1.4) (Dewick, 2009; Fraga, 2007).

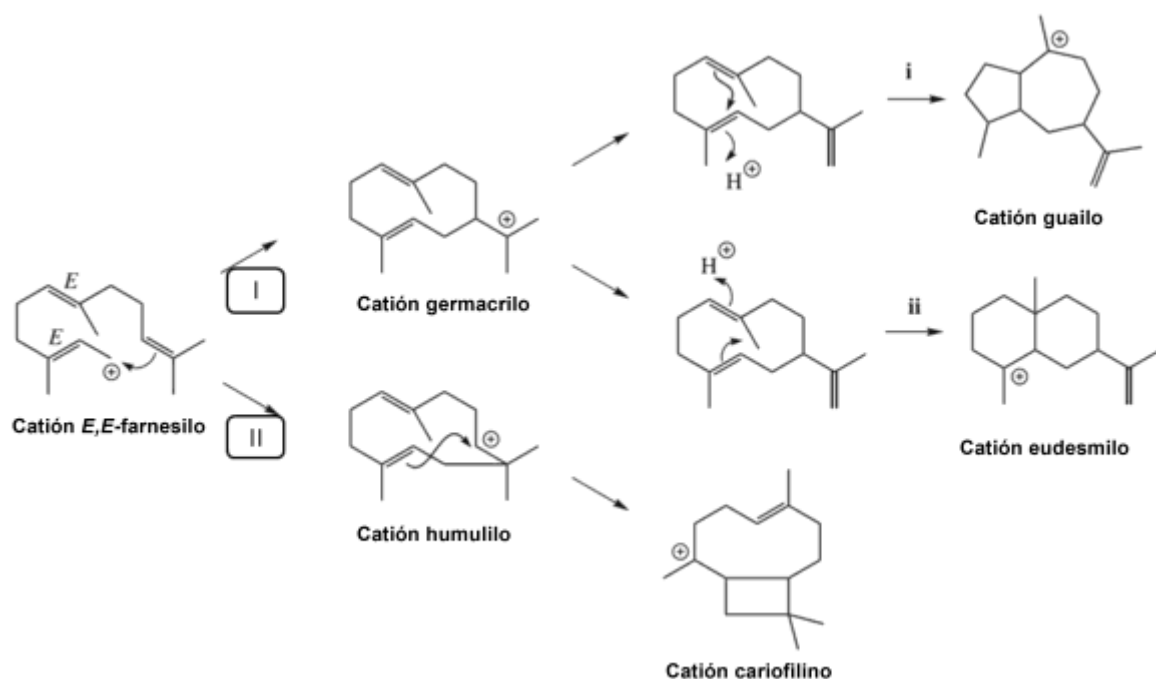


Figura 1.4. Reacciones de ciclación del FPP que dan lugar a algunos grupos de sesquiterpenos (Dewick, 2009).

Históricamente se ha aceptado de manera general que la biosíntesis de los sesquiterpenos en plantas se da exclusivamente a través de la vía MVA en el citosol. Sin embargo, estudios recientes han demostrado el origen metabólico mixto de las unidades isoprenicas de la artemisinina (Schramek *et al.*, 2010). Esto sugiere que las unidades precursoras de los sesquiterpenos pueden tener un origen biosintético mixto a través de un intercambio de unidades C5 entre el citosol y los plastidios, aunque esto aún no ha sido corroborado en otros modelos.

La gran diversidad estructural de los sesquiterpenos puede ser explicada principalmente por la presencia de los tres dobles enlaces en la estructura del FPP, lo cual brinda un gran número de posibles puntos de ciclación, además de múltiples isómeros posibles. Es importante considerar que pequeños cambios en la secuencia de las enzimas responsables de estas reacciones permiten la aparición de estructuras novedosas y que la diversidad estructural de los sesquiterpenos está, además, asociada a la gran diversidad enzimática (Degenhardt *et al.*, 2009).

1.3. Guaianos

Los guaianos son un grupo de sesquiterpenos que comparten un esqueleto carbonado bicíclico, que se origina a partir de la ciclación del *E,E*-FPP (Figura 1.4). Los guaianos se caracterizan por presentar dos anillos carbonados de cinco y siete átomos de carbono fusionados, respectivamente. Este sistema bicíclico se origina a través de la formación de un nuevo enlace entre los C-1 y C-5 del catión germacrilo para formar el catión guailo, del cual derivan los guaianos (Figura 1.4). Una segunda característica estructural que comparte la mayoría de los derivados del guaiano es el grupo isopropileno unido al carbono C-7. Este grupo isopropileno puede aparecer sustituido y normalmente se encuentra oxidado.

1.4. Guaianólidos

Los guaianólidos son un grupo particular dentro de la familia de los guaianos. En el caso de los guaianólidos el grupo metilo libre de la porción isopropilénica se encuentra oxidado a ácido carboxílico, mientras que el carbono en posición seis del anillo mayor del esqueleto guaiano se encuentra oxidado a alcohol secundario. La distribución espacial entre el grupo oxhidrilo y el ácido carboxílico permite la formación no enzimática de una lactona, siendo este grupo funcional el principal responsable de la actividad biológica de los guaianólidos (Drew *et al.*, 2009; Simonsen *et al.*, 2013).

El conocimiento respecto a la biosíntesis de los guaianólidos es limitado y hasta el momento sólo los primeros pasos de reacción han podido ser descritos (Figura 1.5). Sin embargo, y a pesar de las diferencias estructurales, se cree que las reacciones que dan origen a estos sesquiterpenos son similares a las que dan origen a otros metabolitos ampliamente estudiados, como es el caso de la artemisinina (Drew *et al.*, 2009).

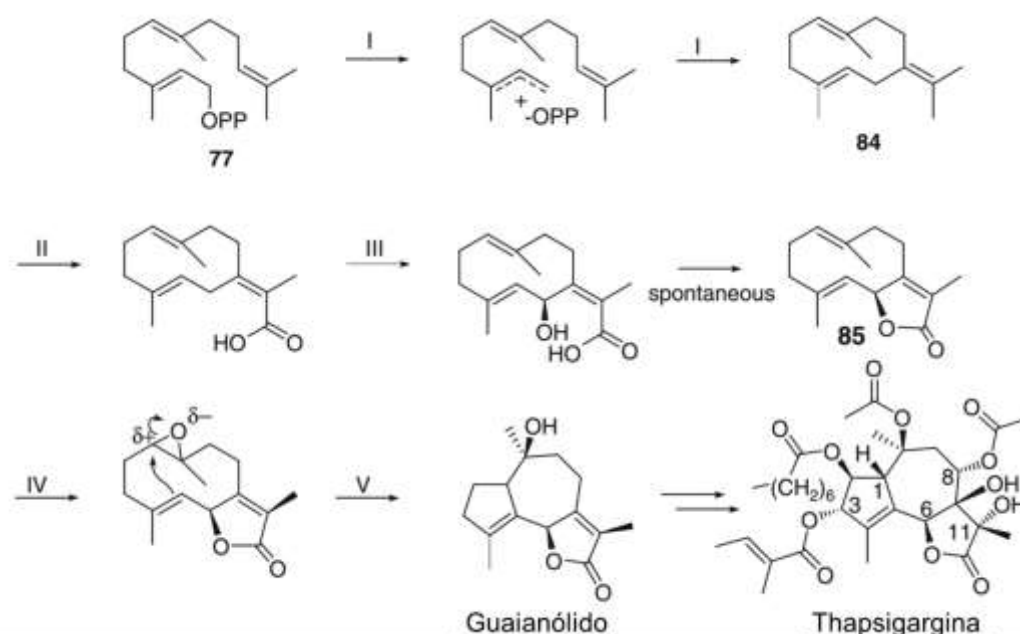


Figura 1.5. Esquema de biosíntesis del guaianólido thapsigargina. I) Germacrene B sintasa, II) y III) enzimas similares al citocromo P450, IV) y V) enzimas desconocidas (Simonsen *et al.*, 2013).

1.5. Trinorguaianos

Los trinorguaianos son un grupo de sesquiterpenos con 12 átomos de carbono aislados de fuentes marinas y terrestres (Blay *et al.*, 2006). Un ejemplo es la clavukerina A, un derivado trinorguaiano aislado del coral *Clavularia koellikeri* (Kobayashi *et al.*, 1983). Se ha demostrado su origen sesquiterpénico por ensayos de incorporación de ^{13}C (Takeda y Katoh, 1983) y por ensayos de incorporación de ^{14}C en especies de coral suave *Heteroxenia sp* (Dai *et al.*, 1991).

Los trinorguaianos se caracterizan por la pérdida del grupo isopropileno típico en los guaianos. Pérdidas similares se han visto en otros sesquiterpenos bicíclicos y se ha propuesto que el grupo isopropileno se pierde en forma de acetona de manera no enzimática, aunque el mecanismo no ha sido completamente elucidado (Dickschat *et al.*, 2005) (Figura 1.6).

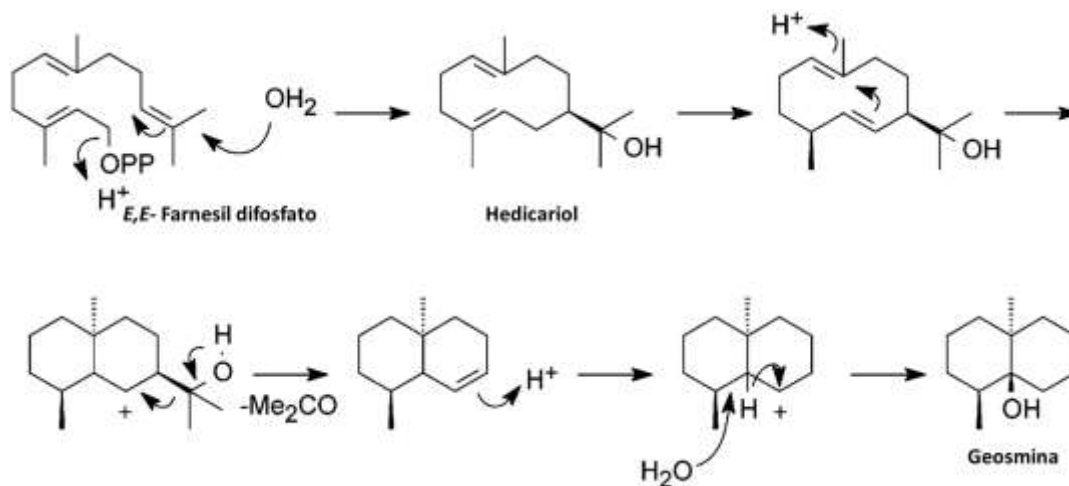


Figura 1.6. Biosíntesis de la geosmina en la myxobacteria *Myxococcus xanthus* (Dickschat *et al.*, 2005).

1.6. Terpenos en *Pentalinon andrieuxii*

Pentalinon andrieuxii (Müller Argoviensis) B. F. Hansen & R. P. Wunderlin es una planta perteneciente al orden Gentianales y a la familia Apocynaceae. Es nativa de México y Centroamérica y se distribuye desde Nicaragua hasta el sur mexicano, incluyendo a la península de Yucatán (GBIF Secretariat, 2019). A partir de *P. andrieuxii* se han aislado metabolitos secundarios como esteroides (Yam-Puc *et al.*, 2012), esteroides, cumarinas, pregnanos (Pan *et al.*, 2012), triterpenoides (Domínguez-Carmona *et al.*, 2010; Yam-Puc *et al.*, 2013) y dos trinorsesquiterpenos de estructura química inusual denominados urechitol A y urechitol B (Yam-Puc *et al.*, 2009).

Los urechitoles A y B son moléculas de tipo terpenoide, con un esqueleto constituido por 12 átomos de carbono que presenta una estructura tetracíclica, tres de estos ciclos son heterociclos con un átomo de oxígeno cada uno (Yam-Puc *et al.*, 2009). Una proyección hipotética de las estructuras oxigenadas de los urechitoles hacia un esqueleto puramente carbonado, da como lugar un sistema bicíclico, compuesto por un anillo de cinco átomos de carbono fusionado a otro anillo de siete miembros. A este esqueleto hipotético se lo ha denominado como esqueleto de campechano y se propone como la base biosintética de los urechitoles (Figura 1.7c). La estructura bicíclica del esqueleto campechano recuerda a la estructura de los trinorguaianos, observándose la conservación de un anillo A de cinco miembros y un anillo B de siete. Por otro lado, la presencia de un grupo hemiacetal y la posición del metilo C-15 del esqueleto trinorguaiano en el anillo A del urechitol A (C-15 es ahora un carbono terciario oxigenado) sugieren un importante rearrreglo estructural que debe incluir la ruptura de uno de los enlaces carbono-carbono del anillo A (Figura 1.7).

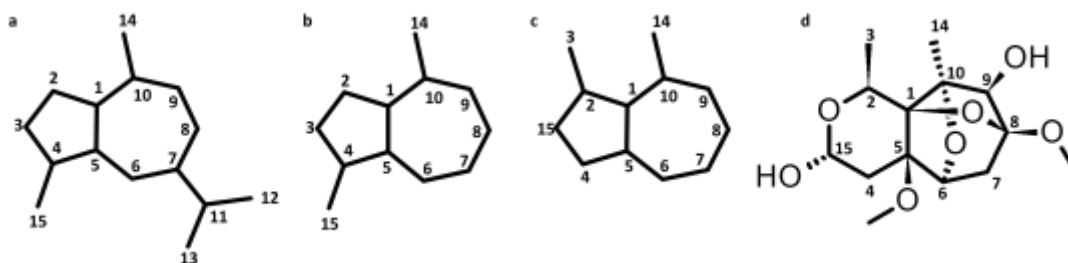


Figura 1.7. Estructura química del esqueleto guaianolide (a), esqueleto trinorguaianolide (b), esqueleto campechanolide (c) y urechitol A (d).

Si bien, el conocimiento fitoquímico en relación a *P. andrieuxii* ha crecido considerablemente en los últimos 25 años, la comprensión respecto a la biosíntesis de algunos de sus metabolitos secundarios sigue siendo limitada. En este sentido, se han realizado estudios de marcaje isotópico utilizando $^{13}\text{CO}_2$ como precursor, en los que, por primera vez, se pudo confirmar experimentalmente el origen biosintético de lupeol (Peña-Rodríguez *et al.*, 2014). Mientras que la ruta biosintética del ácido betulínico y de los derivados del lupeol se encuentran bien establecidas (Dewick, 2009), poco se sabe de los orígenes biosintéticos de urechitol A y de los derivados con esqueleto campechano. En el estudio mencionado anteriormente no pudo ser detectada la incorporación de la marca de carbono 13 al urechitol A, posiblemente debido a que la biosíntesis del mismo no se estaba llevando a cabo durante el experimento. Debido a lo anterior, más recientemente, pudo ser establecida una relación entre el desarrollo de *P. andrieuxii* y la acumulación de urechitol A en sus raíces (Hiebert-Giesbrecht *et al.*, 2016), lo cual ha permitido proponer nuevos experimentos de marcaje con carbono 13 para explorar los posibles orígenes biosintéticos de urechitol A y los derivados con esqueleto campechano.

1.7. Estrategias para el estudio biosintético de metabolitos secundarios

La biosíntesis de un metabolito secundario consiste en una serie de reacciones de química orgánica en las que un precursor, por lo general de estructura sencilla, es transformado en un producto. Normalmente, cada uno de estos pasos de reacción es catalizado por una enzima cuya afinidad por el sustrato es considerable. Es por esto que una estrategia generalmente utilizada para el estudio de la biosíntesis de los metabolitos secundarios es el suministro de sustratos para la reacción a estudiar. Los sustratos (o precursores) son previamente marcados con un isótopo, el cual permite identificar el efecto de la reacción en el precursor durante el análisis espectroscópico del metabolito aislado (Dewick, 2009).

Los precursores marcados isotópicamente pueden ser muy diversos y su elección estará en función del detalle con el cual se pretenda entender cada paso de la biosíntesis. En ese sentido, los principales isótopos utilizados son los isótopos del carbono (^{13}C y ^{14}C) y los isótopos del hidrógeno (deuterio y tritio). Tanto el ^{14}C como el tritio son isótopos radioactivos y estos han permitido aumentar la sensibilidad en los métodos de detección cuando aparecieron disponibles en el mercado. Sin embargo, la aparición de técnicas espectroscópicas actuales, de gran sensibilidad, permite la utilización de isótopos “fríos”, con el correspondiente aumento en seguridad y diversidad de aplicaciones (Bentley, 1999).

La elección del precursor marcado también depende del conocimiento previo que se tenga sobre la ruta biosintética del metabolito de interés; en este sentido, los precursores se pueden clasificar en generales y específicos. Los precursores específicos son diseñados específicamente como sustratos para la enzima que cataliza uno o algunos pasos particulares dentro de una ruta biosintética determinada y normalmente en los pasos finales de la misma. Este tipo de estrategia permite entender con bastante detalle las reacciones que son catalizadas por las enzimas estudiadas (Simpson, 1998). Los precursores generales son principalmente moléculas que se encuentran al inicio de las vías biosintéticas. Es decir, se trata de moléculas derivadas del metabolismo primario y que sirven de base para formar los bloques de construcción del metabolismo secundario. El acetato, el mevalonato, el piruvato y la desoxixilulosa son ejemplos de precursores generales para el estudio de las vías MVA y MEP, en el caso de los terpenos. La utilización de unos u otros sólo permitirá el marcaje en los productos que se biosinteticen por las vías correspondientes.

Este enfoque es ampliamente utilizado al estudiar organismos heterótrofos, como microorganismos en medios de cultivo o plantas *in vitro*, ya que son capaces de incorporar azúcares y otros componentes del sustrato como fuente de carbono, los cuales, a su vez, pueden estar marcados isotópicamente (Dai *et al.*, 1991; Dickschat *et al.*, 2004). Por lo general, los organismos estudiados por esta estrategia son cultivados en condiciones controladas y el medio de cultivo en el cual crecen es enriquecido con los precursores de interés. Si bien, existen ejemplos en los cuales se ha utilizado esta estrategia de marcaje en plantas fotosintéticamente activas, el proceso generalmente implica la disección de tejido para realizar el experimento y la suposición de que el

proceso completo de biosíntesis del metabolito en estudio se lleve a cabo en ese tejido y no requiera un aporte sistémico de otras partes de la planta (May *et al.*, 2013).

Existen precursores aún más generales que permitirán el marcaje de múltiples metabolitos, incluidos aquellos que no provengan necesariamente de la vía metabólica estudiada. Un ejemplo de este tipo de precursores es el dióxido de carbono marcado con carbono 13 ($^{13}\text{CO}_2$), el cual participa activamente en todos los procesos metabólicos de los organismos fotosintéticos y por lo tanto suministra bloques de construcción marcados isotópicamente a todo el metabolismo secundario (Römisch-Margl *et al.*, 2007; Simpson, 1998). Una clara ventaja al utilizar $^{13}\text{CO}_2$ como precursor es la posibilidad de utilizar la planta completa durante el experimento, lo cual permite el marcaje de metabolitos aun cuando sean biosintetizados en diferentes tejidos de la planta.

El marcaje de metabolitos utilizando $^{13}\text{CO}_2$ consiste en someter a la planta entera, en condiciones casi naturales, a un pulso fotosintético bajo una atmósfera sintética enriquecida con $^{13}\text{CO}_2$, seguido de un periodo de fotosíntesis bajo una atmósfera natural, rica en $^{12}\text{CO}_2$. Hipotéticamente, se espera que todos los carbohidratos, producto de la fotosíntesis durante el pulso, estén constituidos íntegramente por ^{13}C . Esta cantidad limitada de azúcares marcados universalmente con ^{13}C posteriormente ingresará al metabolismo primario y secundario a través de la glicólisis, transfiriendo esa misma marca isotópica a todos los productos metabólicos. Los precursores (acetato, mevalonato, piruvato o desoxixilulosa) que deriven de estos azúcares íntegramente marcados presentarán un patrón de marcaje específico y permitirán identificar el origen de cada unidad isoprénica en el esqueleto carbonado de los terpenoides (Römisch-Margl *et al.*, 2007).

Al utilizar precursores marcados muy generales como el $^{13}\text{CO}_2$, se obtiene una mezcla relativamente compleja de isotopólogos para cada metabolito estudiado. Esta mezcla de isotopólogos puede ser analizada por espectroscopía de masas y por resonancia magnética nuclear, permitiendo establecer el origen biosintético de cada unidad isoprénica con base en el patrón de marcaje característico. Un reciente ejemplo de esto es el establecimiento del origen biosintético de las tres unidades isoprenoides de la artemisinina, una sesquiterpenlactona aislada de la planta asiática *Artemisia annua* y que actualmente es el fármaco de referencia para el tratamiento de la malaria. Tradicionalmente se había asumido que la artemisinina, por ser un sesquiterpenoide, se

formaba íntegramente a través de la vía MVA y que su biosíntesis se llevaba a cabo en el citoplasma. Sin embargo, estudios con $^{13}\text{CO}_2$ permitieron establecer que tan sólo la primera y la última unidad isoprenoide en la artemisinina provienen de la vía MVA, mientras que la unidad intermedia proviene de la vía MEP. Esto sugiere que, a diferencia de lo que se había sugerido tradicionalmente, existe un flujo de precursores entre los compartimientos celulares (Bacher *et al.*, 2016).

JUSTIFICACIÓN

Los metabolitos secundarios representan una parte fundamental en la relación de las plantas con su ambiente. La gran diversidad estructural que existe entre los metabolitos secundarios es el resultado del alto grado de especialización que han alcanzado para permitir adaptarse a las plantas que lo producen a las condiciones que el ambiente les impone. En ese sentido, desde los inicios de la química orgánica se ha buscado no sólo caracterizar estructuralmente a estas moléculas, sino entender también los procesos que les dan origen. De esta manera, la información respecto a procesos de biosíntesis, acumulada a lo largo de las últimas décadas, permite en la actualidad identificar el origen biosintético de un gran número de metabolitos secundarios, basándose exclusivamente en la similitud que el esqueleto carbonado de estos pueda tener con otros ya conocidos.

Los urechitoles A y B, aislados de *P. andrieuxii*, presentan un esqueleto carbonado novedoso y una estructura tridimensional poco común y es debido a esta novedad que resulta difícil asignar un origen biosintético a estas nuevas moléculas. Por lo tanto, es de gran interés para el área de la química de los productos naturales en particular y para la ciencia en general entender el proceso de biosíntesis que da lugar a los urechitoles.

HIPÓTESIS

El urechitol A y el ácido betulínico son terpenoides presentes en *P. andrieuxii*. Mientras el ácido betulínico es un triterpeno de tipo lupano, biosintetizado por la vía del mevalonato, el urechitol A pertenece a un nuevo grupo de terpenos con origen biosintético desconocido. Dada la similitud estructural del urechitol A con los sesquiterpenos de tipo guaiano, es razonable suponer que se originan por una vía biosintética similar. En ese sentido, se propone que las unidades isoprénicas que conforman el urechitol A provienen de la vía del metil-eritritol-fosfato (MEP).

OBJETIVO GENERAL

Establecer el origen biosintético del urechitol A utilizando precursores marcados con carbono 13.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las condiciones para obtener urechitol A y ácido betulínico marcados con carbono 13.
2. Analizar la distribución de isotopólogos e isotopómeros de urechitol A y ácido betulínico aislados a partir de experimentos de pulso-acumulación con $^{13}\text{CO}_2$ en plantas de *P. andrieuxii* y comparar los patrones de marcaje obtenidos.
3. Identificar líneas transgénicas de *P. andrieuxii* sobreproductoras de urechitol A y ácido betulínico.

CAPITULO II

MARCAJE DE URECHITOL A Y ÁCIDO BETULÍNICO POR EXPERIMENTOS DE PULSO-ACUMULACIÓN CON $^{13}\text{CO}_2$ Y ANÁLISIS ISOTOPOLÓGICO E ISOTOPOMÉRICO DE LOS PRODUCTOS DE MARCAJE

2.1. INTRODUCCIÓN

El análisis de incorporación isotópica es una herramienta fundamental para la disección y el estudio de los procesos metabólicos y biosintéticos. Los primeros experimentos de marcaje isotópico utilizaron deuterio (^2H) en los años 1930's debido a la aparición comercial del agua pesada ($^2\text{H}_2\text{O}$) (Schoenheimer y Rittenberg, 1935). A partir de ahí y hasta la década de 1960 el uso de isótopos en bioquímica estuvo mayormente dominado por los radioisótopos tritio (^3H) y ^{14}C (Calvin y Benson, 1949; Kamen, 1947). Posteriormente, varios factores condujeron a un cambio gradual hacia el uso de isótopos estables, principalmente debido a la mayor seguridad en el uso de este tipo de marcadores. Además, el notable avance analítico en técnicas como la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas permitieron obtener niveles de sensibilidad suficientemente altos para la detección de isótopos no radioactivos (Bothwell y Griffin, 2011; Boughton *et al.*, 2016).

Los estudios de marcaje isotópico para el análisis de procesos metabólicos y biosintéticos inician con la inducción artificial de una perturbación en la abundancia natural de los isótopos, alterando la composición isotópica natural. Este agente perturbante, o precursor, puede estar universalmente enriquecido con el isótopo marcador o bien puede presentar un exceso del isótopo de interés en sitios particulares de la molécula. Sin embargo, lo fundamental es que el precursor utilizado pueda acceder a la red metabólica del organismo en estudio (Bacher *et al.*, 2016). La selección de un isótopo marcador adecuado depende de varios factores, en los que se incluyen la disponibilidad comercial del mismo, la capacidad de asimilación del precursor en el organismo en estudio y la existencia (o ausencia) de una hipótesis lo suficientemente sólida respecto a la relación biosintética del precursor marcado y el metabolito de interés. Debido a lo anterior, es necesario un profundo análisis previo a la realización de los estudios de incorporación de marcadores isotópicos, para poder elegir el sistema apropiado para responder la pregunta de investigación.

En ese sentido, el sistema bicíclico del esqueleto carbonado del campechano, conformado por un anillo de cinco y otro de siete miembros, presenta gran similitud al sistema bicíclico característico de los sesquiterpenoides de tipo guaiano. Debido a esto se propone que los derivados del campechano, como el urechitol, comparten un origen biosintético común al de los guaianos, al menos de manera parcial (Figura 2.1).

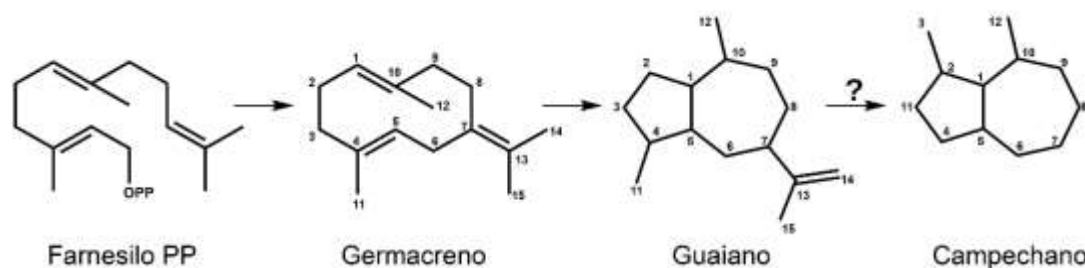


Figura 2.1. Esquema simplificado de la biosíntesis de los derivados del campechano a partir del difosfato de farnesilo.

Algunos de los principales intermediarios en la biosíntesis de los guaianos son los isómeros del germacreno que, a su vez, son los productos de la ciclación del farnesil pirofosfato, precursor universal de los sesquiterpenos (Bülow y König, 2000; Steliopoulos *et al.*, 2002). Los isómeros del germacreno son los precursores inmediatos de todos los sesquiterpenoides bicíclicos, incluyendo a los guaianos y, por lo tanto, posibles intermediarios en la biosíntesis de los campechanos (Bülow y König, 2000; De Kraker *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2006) Si bien, no existen muchos estudios que revelen el mecanismo biosintético de los guaianos, hay información disponible acerca de la biosíntesis de los germacrenos. Siguiendo esta línea de razonamiento, se plantea que la ruta biosintética que da origen a los derivados con esqueleto de campechano inicia por la ciclación del *E,E*-FPP a un derivado del germacreno, presumiblemente el germacreno A, tomando en cuenta el conocimiento sobre la biosíntesis de los guaianos (Simonsen *et al.*, 2013). A partir del germacreno A, por medio de la formación de un enlace covalente entre los carbonos 1 y 5, se obtendría el sistema bicíclico conformado por un anillo de cinco y otro de siete átomos de carbono, estructura base de los guaianos (Figura 2.1).

Una diferencia particular entre la estructura de los guaianos en general y de los urechitoles es la ausencia en estos últimos del fragmento isopropílico unido al carbono siete (Figura 2.1). Los trinorguaianos son metabolitos secundarios raramente descritos en la literatura, pero ejemplos de ellos han sido aislados a partir de fuentes marinas y terrestres (Blay *et al.*, 2006). Uno de los ejemplos mejor descritos es el de la clavukerina A

(Figura 2.2), un tri-nor-guaiano aislado a partir del coral blando *Clavularia koellikeri* en las costas de Japón (Kobayashi *et al.*, 1983). Si bien, existen varios estudios que proponen rutas para la obtención de clavukerina A por síntesis químicas (Blay *et al.*, 2006; Honda *et al.*, 1994; Knüppel *et al.*, 2010), los reportes describiendo su biosíntesis son muy escasos y poco concluyentes (Dai *et al.*, 1991).

A pesar de la escasez de estudios sobre la biosíntesis de los trinorguaianos, puede asumirse que siguen la misma ruta biosintética que los guaianos, con la posterior pérdida del fragmento isopropílico en la posición siete, previamente descrita. Esta pérdida de tres átomos de carbono ha sido descrita en otro trinorsesquiterpeno bicíclico, la geosmina (Figura 2.2) (Jiang y Cane, 2008). Si bien, la evidencia presentada hasta el momento parece indicar que la pérdida del grupo isopropílico, en forma de acetona, se da de manera conjunta durante la formación del sistema bicíclico conformado por dos anillos de seis átomos de carbono (Dickschat *et al.*, 2005), el mecanismo por el cual esto sucede parece admitir la posibilidad de la formación alternativa del sistema bicíclico observado en los guaianos. Adicionalmente, no puede descartarse que el cierre del sistema bicíclico ocurra de manera independiente a la pérdida del grupo isopropilo, por lo cual puede sugerirse con relativa confianza que las etapas finales del mecanismo por el cual se producen los tri-nor-guaianos puede ser muy similar al observado en el caso de la geosmina.

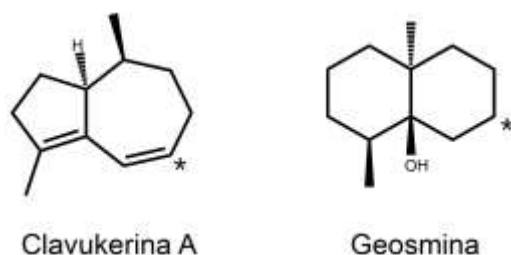


Figura 2.2. Estructura química de trinorsesquiterpenos bicíclicos. *Posición en la cual se perdió un grupo isopropilo.

Posteriormente, un rearrreglo importante en el anillo A, con la rotura de un enlace C-C y la oxidación de dos posiciones darían como resultado la formación de un grupo alcohol y un aldehído en posiciones favorables (2 y 11, respectivamente), permitiendo la formación de un hemiacetal cíclico, completando la biosíntesis del esqueleto central de los urechitoles. Finalmente, una serie de oxidaciones y metilaciones producirían la estructura final del urechitol A (Figura 2.3).

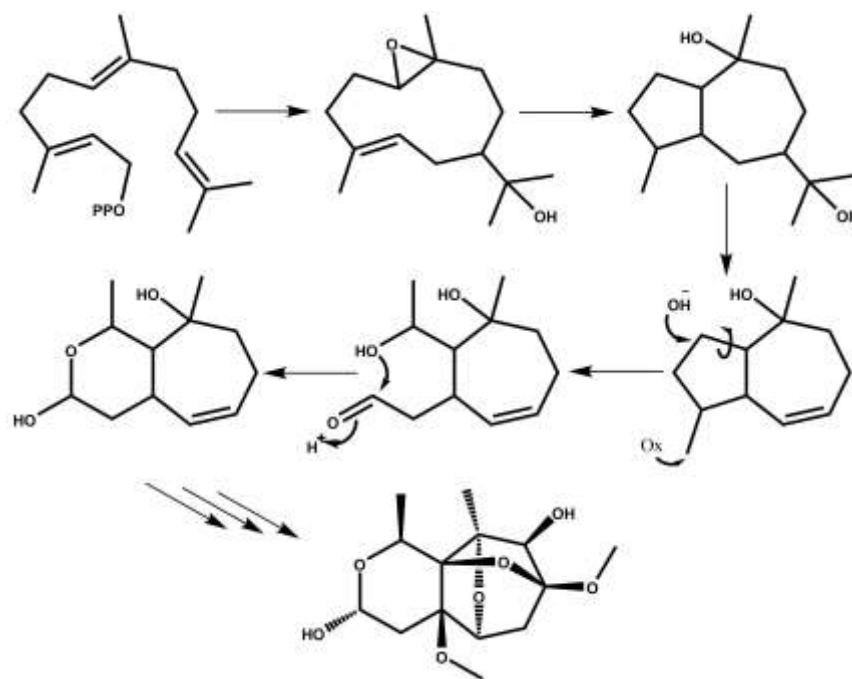


Figura 2.3. Propuesta de ruta biosintética del urechitol A.

A diferencia del urechitol A y de los derivados del campechano, el ácido betulínico es un metabolito secundario ampliamente distribuido en la naturaleza (Jäger *et al.*, 2009). Existen numerosos reportes referentes a su aislamiento e identificación, actividad biológica y a la manipulación biotecnológica de organismos vegetales y fúngicos para su producción a gran escala (Wu *et al.*, 2017; Chatterjee *et al.*, 2000). La estructura química del ácido betulínico corresponde al grupo de los triterpenos del tipo lupano, para el cual ya han sido bien establecidos los pasos biosintéticos que les dan origen (Huang *et al.*, 2012). La biosíntesis de los lupanos se inicia por la vía del mevalonato. Dos unidades de IPP son condensadas con una unidad de DMAPP de manera cabeza-cola, para dar lugar a una unidad de FPP. Posteriormente, dos unidades de FPP forman un enlace covalente en orientación cola-cola, dando lugar al escualeno, precursor universal de los triterpenos. Finalmente, el óxido de escualeno sufre reacciones de ciclación y un rearrreglo en el anillo D para dar lugar al lupeol, primer miembro del grupo de los lupanos. La oxidación del carbono 28 del lupeol dará lugar a la betulina, al aldehído betulínico y, finalmente, al ácido betulínico (Jin *et al.*, 2019). Recientemente, el mecanismo biosintético del lupeol fue confirmado experimentalmente por medio de experimentos de pulso/acumulación utilizando $^{13}\text{CO}_2$ (Peña-Rodríguez *et al.*, 2014).

Desde el aislamiento e identificación de los urechitales se han llevado a cabo varios intentos por establecer el origen biosintético de los mismos, desde la generación de modelos *in vitro* como callos en suspensión, raíces *in vitro* y raíces transformadas, para la realización de experimentos de marcaje isotópico por estas vías. Sin embargo, en ninguno de estos modelos pudo detectarse la producción de urechitales. Debido a esto es necesaria la aplicación de una técnica de marcaje isotópico utilizando un precursor universal para el metabolismo vegetal, como lo es el CO₂. Para este fin, plantas seleccionadas de *P. andrieuxii* fueron germinadas y cultivadas en el Centro de Cultivo “Gewächshauslaborzentrum Dürnast”, una división de la Universidad Técnica de Múnich en Dürnast, Alemania. Posteriormente fueron sometidas a un pulso fotosintético durante el cual el ¹²CO₂ de la atmósfera fue reemplazado por ¹³CO₂ en una atmósfera sintética. Es de esperar que la incorporación de ¹³C en la estructura de los urechitales siga patrones específicos, dependiendo del origen biosintético de las unidades isoprénicas (Figura 2.4) y, por lo mismo, puedan predecirse diferentes patrones de distribución isotopológica. El ácido betulínico, cuyas unidades precursoras de IPP y DMAPP se originan íntegramente a través de la vía MVA, presentará una distribución isotopológica de dos isotopólogos M+2 por cada isotopólogo M+1, mientras que para el urechitol A es de esperarse una abundancia relativa de cinco isotopólogos M+2 por cada dos isotopólogos M+1, debido a la pérdida del grupo isopropilo discutida anteriormente. Finalmente, es de esperarse una distribución isotopológica de dos isotopólogos M+3 y tres isotopólogos M+2 en caso que las unidades C5 que conforman al urechitol A provengan por la vía MEP.

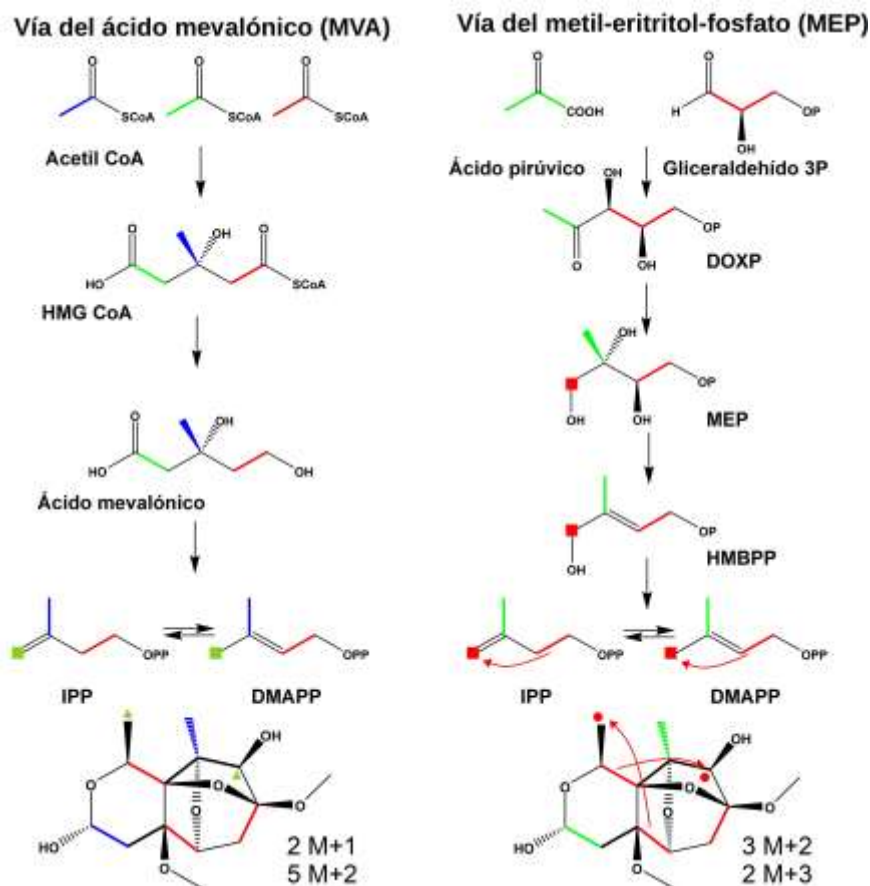


Figura 2.4. Distribución de isotopólogos de urechitol A de acuerdo al origen biosintético de los precursores IPP y DMAPP. Las líneas indican pares de ^{13}C , los triángulos indican marcas individuales de ^{13}C . En la vía MEP las flechas representan unidades M+3 con un acoplamiento a larga distancia.

En este capítulo se reportan los resultados de los experimentos de marcaje isotópico utilizando $^{13}\text{CO}_2$ como precursor marcado en plantas completas de *P. andrieuxii*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Germinación de semillas y cultivo de *P. andrieuxii*

Semillas de *P. andrieuxii* fueron germinadas y cultivadas bajo condiciones controladas en el Centro de Cultivo “Gewächshauslaborzentrum Dürnast”, una división de la Universidad Técnica de Múnich en Dürnast, Alemania. Dos grupos de 12 plantas cada uno fueron germinados con una diferencia de un mes. Cada grupo creció bajo condiciones de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad por un periodo de seis meses. La temperatura fue fijada a 25 °C y la humedad relativa del ambiente a 75%. Las plantas fueron retiradas de

la cámara de crecimiento para los experimentos de marcaje en la Facultad de Química en Garching, Alemania y devueltas posteriormente para el periodo de acumulación.

2.2.2. Experimentos de pulso/acumulación con $^{13}\text{CO}_2$ en plantas de *P. andrieuxii*

Un total de 10 individuos fueron sometidos a experimentos de perturbación isotópica con $^{13}\text{CO}_2$ con diferentes relaciones de pulso/acumulación (Figura 2.5). Cada planta fue colocada individualmente en una cámara de gas cerrada e iluminada con luz blanca (20,000 lx). La temperatura fue ajustada a 25 °C y la humedad relativa se mantuvo a 60% durante todo el experimento. El CO_2 natural (sin marca isotópica) fue removido de la cámara con un lavado utilizando una mezcla de aire sintética, conteniendo exclusivamente oxígeno (20.5%, v/v) y nitrógeno (79.5%, v/v). Posteriormente, se permitió el ingreso de gas $^{13}\text{CO}_2$ (99.9% de enriquecimiento en ^{13}C) y su concentración fue ajustada a 800 ppm durante el periodo de un pulso). Las plantas fueron entonces removidas de la cámara de gas y se les permitió crecer bajo las condiciones normales de la cámara de cultivo mencionada en la sección anterior por un periodo de acumulación (Figura 2.5). Finalizado el periodo de acumulación, las plantas fueron separadas en raíces, tallos y hojas y preparadas para su extracción y análisis.

Las raíces de 10 individuos fueron extraídas y se analizó el contenido y el nivel de incorporación de ^{13}C en el urechitol A en nueve de las muestras, mientras que una fue reservada como control. Como pulso corto se contemplaron experimentos con 12 h de duración, mientras que experimentos con pulsos de 16 h fueron considerados como largos. Los periodos de acumulación fueron divididos en cortos (5 días), medios (7 días) y largos (15 días). Tres experimentos (PAT-13, PAT-14 y PAT-15) fueron sometidos a las condiciones de pulso corto y acumulación media, por lo cual son considerados equivalentes. El material vegetal de PAT-15 no fue extraído y fue reservado como control.



Figura 2.5. Esquema de distribución de experimentos en periodos de pulso/acumulación.

Adicionalmente, dos plantas fueron sometidas a un pulso de cinco horas y un periodo de acumulación de seis días, siguiendo las mismas condiciones explicadas anteriormente. De estas plantas se separaron las hojas, las cuales fueron cortadas en trozos pequeños, congelados con nitrógeno líquido, liofilizadas y molidas en un mortero hasta obtener un polvo fino. El polvo fino fue extraído con metanol y el extracto metanólico seco fue fraccionado con diclorometano para obtener la fracción LP-27, de la cual posteriormente se aisló ácido betulínico.

2.2.3. Obtención de fracciones diclorometánicas a partir de las raíces de *P. andrieuxii*

Posterior a su tratamiento con $^{13}\text{CO}_2$ se procedió a colectar las raíces de las plantas tratadas. Las mismas fueron cortadas y lavadas con abundante agua para eliminar residuos del sustrato. Una vez limpias, las raíces fueron cortadas en trozos pequeños utilizando tijeras de podar y congeladas con nitrógeno líquido. Las raíces congeladas fueron molidas utilizando una licuadora hasta obtener un polvo fino. El polvo de raíces fue tratado con una disolución de ácido clorhídrico 0.1 N, filtrado y lavado con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. Las raíces pre-tratadas fueron posteriormente extraídas con metanol grado HPLC y bajo sonicación por 20 min. El extracto metanólico fue concentrado a presión reducida hasta obtener un extracto metanólico seco. El extracto metanólico seco fue entonces extraído con 100 mL de diclorometano bajo sonicación por 20 min. Todos los pasos de extracción fueron realizados por triplicado. La fracción diclorometánica obtenida

fue finalmente concentrada a sequedad a presión reducida hasta obtener la fracción diclorometánica seca. Todas las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta ser analizadas o procesadas adicionalmente.

2.2.4. Purificación de ácido betulínico marcado con ^{13}C a partir de la fracción diclorometánica de hojas (LP-27) y análisis por CG-EM y RMN

2.2.4.1. Purificación de ácido betulínico

Las fracciones diclorometánicas (LP-27) del extracto metanólico obtenido a partir de las hojas de *P. andrieuxii* tratadas con $^{13}\text{CO}_2$, fueron purificadas utilizando cromatografía líquida al vacío (VLC) y cromatografía en columna de gravedad (CCG).

2.2.4.1.1. Cromatografía líquida al vacío de LP-27

La fracción LP-27 fue separada por VLC utilizando gel de sílice de grado “cromatografía en capa delgada” (CCD) (Sigma-Aldrich) como fase estacionaria, en una columna de 2.5 cm de diámetro interno y 5 cm de altura. La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de hexano y acetona, iniciando con dos fracciones de 100% hexano, seguidas por un aumento gradual en la proporción de acetona (2% por fracción), hasta alcanzar una proporción de 60:40 de hexano-acetona. Por último, la columna fue lavada con dos fracciones de acetona al 100% y una última fracción de metanol al 100%. El volumen de cada fracción colectada fue de aproximadamente 100 mL y se obtuvo un total de 25 fracciones.

Las fracciones fueron reunidas de acuerdo a su similitud por cromatografía en capa delgada (CCD) y la fracción rica en ácido betulínico (PAR-4D, 42.2 mg) fue identificada por comparación con una muestra de referencia (Sigma-Aldrich).

2.2.4.1.2 Cromatografía en columna de gravedad de PAR-4D

Sucesivamente, PAR-4D fue sometida a una separación cromatográfica por CCG utilizando gel de sílice con un tamaño de partículas de 0.063-0.200 mm de diámetro (Merck), empacado a una altura de 40 cm en una columna de vidrio con un diámetro interno de 1 cm. La muestra fue aplicada en una cabeza sólida y eluida de manera isocrática con una mezcla de Cloroformo-Hexano-Acetona (63:30:5). Fueron colectadas 165 fracciones de aproximadamente 1 mL cada una.

Las fracciones fueron reunidas con base en su similitud por CCD y aquellas ricas en ácido betulínico (PAR-5C y PAR-5D) fueron identificadas por comparación con una muestra pura de referencia (Sigma-Aldrich). Ambas fracciones fueron reunidas y se obtuvo una muestra (BTA) de 3.2 mg, lo suficientemente pura en ácido betulínico para realizar los siguientes análisis espectroscópicos y espectrométricos.

2.2.4.2. Análisis por GC-EM de ácido betulínico marcado con ^{13}C (BTA)

Una porción de 1 mg de BTA fue adicionada con una disolución (50 μL) de N-(ter-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida conteniendo 1% de cloruro de N-(ter-butildimetilsililo) (TBDMS) y la mezcla se mantuvo a 70 °C por 30 min. El producto resultante fue sometido a análisis por GC-EM, utilizando una columna capilar Equity TM-5 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm). El detector de masas fue operado en modo de impacto electrónico a 70 eV. Una alícuota de la disolución fue inyectada en modo split (1:10) a una temperatura de inyección e interfase de 260 °C. La columna se mantuvo a 150 °C por 3 min, luego de lo cual la temperatura ascendió en un gradiente de 7 °C/min hasta alcanzar una temperatura final de 280 °C. La muestra fue analizada tres veces en modo de monitoreo de ion simple (SIM, por sus siglas en inglés) y el exceso total de ^{13}C fue calculado utilizando un software personalizado, basado en Excel (Lee *et al.*, 1991).

2.2.5. Purificación y análisis de urechitol A marcado con ^{13}C

2.2.5.1. Purificación de urechitol A marcado con ^{13}C a partir de fracciones de extractos de raíces de *P. andrieuxii*

Las fracciones diclorometánicas del extracto metanólico obtenido a partir de las raíces de plantas de *P. andrieuxii* tratadas con $^{13}\text{CO}_2$ fueron separadas por CCG utilizando gel de sílice con tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm (Merck), empacado en una columna de vidrio para la cual el diámetro interno y la altura fueron definidas con base en la cantidad de cada muestra. Las muestras fueron aplicadas en la forma de una cabeza sólida y eluidas con dos sistemas, ambos constituidos por hexano y acetona, el primero en una proporción 8:2 (fracciones 1-100) y el segundo en una proporción de 1:1 (fracciones 101-final).

Las fracciones fueron reunidas de acuerdo a su similitud por cromatografía en capa delgada (CCD) y el urechitol A fue identificado por comparación con una muestra auténtica pura, utilizando un cromatógrafo de gases 6890 acoplado a un detector de masas 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto CA, USA).

2.2.5.2. Análisis por CG-EM de urechitol A puro y en fracciones diclorometánicas

Las fracciones diclorometánicas y las muestras puras de urechitol A fueron comparadas por CG-EM con un estándar auténtico de urechitol A, observando el tiempo de retención y el patrón de fragmentación del urechitol A para su identificación.

Se utilizó un cromatógrafo de gases 6890 acoplado a un detector de masas 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto CA, USA). Los datos fueron adquiridos y analizados utilizando el software Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Palo Alto CA, USA). El cromatógrafo de gases estuvo equipado con una columna capilar HP-5ms (30 m x 0.25 mm) recubierto con una película de 0.25 μm de grosor y con composición de 5% fenil metil siloxano (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). El programa de temperaturas fue establecido a una temperatura inicial de 180 °C, mantenidos por 5 min luego de la inyección, luego de lo cual la temperatura se incrementó a una relación de 5 °C/min hasta alcanzar 300 °C y se mantuvo por 10 min para un tiempo total de 39 min. La inyección (3 μL) fue realizada en modo split con una relación de 50:1 y se utilizó helio de alta pureza como gas acarreador, a un flujo de 1.5 mL/min. El detector de impacto electrónico fue operado a una energía de ionización de 70 eV y en un rango de detección de 50-600 uma.

2.2.5.3. Análisis de enriquecimiento de ^{13}C por CG-EM en muestras puras o enriquecidas en urechitol A

El porcentaje de exceso de ^{13}C fue establecido por comparación de la abundancia relativa de los isotopólogos obtenidos por los experimentos de pulso/acumulación con una muestra auténtica de urechitol A natural. Las muestras fueron analizadas utilizando un cromatógrafo de gases 6890 acoplado a un detector de masas 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto CA, USA) equipado con la misma columna y con el mismo programa de temperaturas mencionados anteriormente. Para el análisis de enriquecimiento isotópico, la detección fue realizada en el modo de monitoreo de ion simple (Single Ion Monitoring – SIM), con enfoque en el ion de m/z 285 (M) y los subsiguientes incrementos discretos en masa atómica hasta alcanzar m/z 299 (M+14). Las abundancias relativas de los iones analizados de las muestras obtenidas a partir de plantas tratadas con $^{13}\text{CO}_2$ fue comparada con la abundancia relativa de los mismos iones en una muestra de urechitol A sin tratamiento con $^{13}\text{CO}_2$. La comparación fue realizada utilizando un programa informático personalizado, desarrollado en los laboratorios de Dr. Wolfgang Eisenreich, en

la cátedra de bioquímica, Facultad de Química, Universidad Técnica de Múnich, basado en el algoritmo de Brauman (Brauman, 1966; Lee *et al.*, 1991).

2.2.5.4. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de urechitol A y ácido betulínico marcado con ^{13}C

Previo al análisis por ^{13}C -RMN, el urechitol A y el ácido betulínico fueron disueltos en 550 μL de cloroformo deuterado (CDCl_3) cada uno. Los espectros de ^{13}C -RMN fueron obtenidos a una temperatura de 300 K utilizando el sistema Avance III 500 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania) equipado con un imán Ultrashield 500 MHz y una crio-sonda (5 mm CPQNP, $1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}/^{19}\text{F}/^{29}\text{Si}$; gradiente-Z). El análisis de datos se realizó utilizando el software MestReNova Versión 7.0.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain).

2.2.6. Extracción y análisis de glucosa y de aminoácidos a partir de hojas, tallos y raíces de plantas de *P. andrieuxii* tratadas con $^{13}\text{CO}_2$

Muestras de hojas, tallos y raíces (20 mg c/u) fueron suspendidas en 0.5 mL de HCl 6 M e incubada por 24 h a 105 °C. Luego de remover el HCl, bajo el flujo de gas nitrógeno seco, se agregaron 200 μL de ácido acético glacial. El hidrolizado fue colocado en una columna Dowex 50W \times 8 (forma H^+ ; malla 200 a 400; 0.5 cm \times 1 cm). La columna fue lavada dos veces con agua y resuelta con 1 mL de NH_4OH 4 M. Una alícuota del eluato fue secada bajo una corriente de gas nitrógeno seco y el residuo fue disuelto en 50 μL de acetonitrilo. Se agregó una disolución (50 μL) de N-(ter-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida conteniendo 1% de cloruro de N-(ter-butildimetilsililo) (TBDMS) y la mezcla se mantuvo a 70 °C por 30 min. El producto resultante fue sometido a análisis por CG-EM, utilizando una columna capilar Equity TM-5 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm). El detector de masas fue operado en modo de impacto electrónico a 70 eV. Una alícuota de la disolución fue inyectada en modo split (1:10) a una temperatura de inyección e interfase de 260 °C. La columna se mantuvo a 150 °C por 3 min, luego de lo cual la temperatura ascendió en un gradiente de 7 °C/min hasta alcanzar una temperatura final de 280 °C. La muestra fue analizada tres veces en modo SIM y el exceso total de ^{13}C fue calculado utilizando un software personalizado, basado en Excel (Lee *et al.*, 1991).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primera medida se analizó el enriquecimiento de ^{13}C en productos de la fotosíntesis (glucosa) y en metabolitos primarios (aminoácidos). Debido a que tanto la glucosa como

los aminoácidos son productos del metabolismo primario, es de esperar que las marcas de ^{13}C sean incorporadas activamente durante el pulso de $^{13}\text{CO}_2$, de manera más rápida que para el caso de los metabolitos secundarios, por lo cual su análisis permitirá tener una idea clara de la eficiencia del proceso de marcaje isotópico utilizando $^{13}\text{CO}_2$. Para este fin fueron analizados la glucosa y los aminoácidos de la planta control (PAT-15) por CG-EM. Cabe recordar que PAT-15 fue sometida a un pulso corto (12 horas) y a un periodo de acumulación medio (7 días).

Los resultados del análisis de incorporación de ^{13}C en los espectros de CG-EM en la glucosa indican que los niveles de incorporación son mayores en los tejidos fotosintéticamente activos y menores en tejidos más alejados. Esto es de esperarse, ya que la marca de ^{13}C es introducida al sistema a través de la fotosíntesis, realizada principalmente en las hojas, y posteriormente distribuida al resto de la planta a través de los fotosintatos. Como se puede observar en la Figura 2.6, el tejido con menores niveles de glucosa marcada con ^{13}C en todas las muestras es la raíz, lo que permite suponer que el marcaje de metabolitos en tejidos profundos requiere más tiempo, probablemente debido a la necesidad de transporte de dichos fotosintatos desde las partes aéreas hasta los órganos profundos. Por lo tanto, sería razonable proponer que mayores periodos de pulso permitirían la incorporación de mayores niveles de la marca isotópica a los fotosintatos, que podrían entonces llegar en mayor medida a tejidos profundos como las raíces.

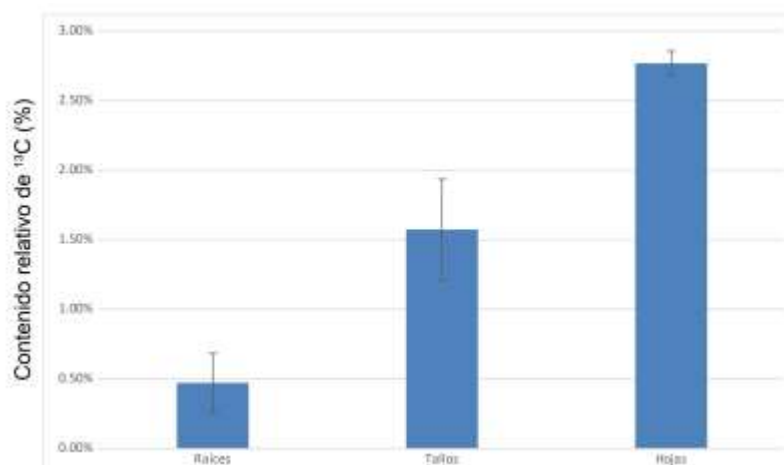


Figura 2.6. Niveles de enriquecimiento de ^{13}C de glucosa en raíces, tallos y hojas de PAT-15, planta control expuesta a un periodo de pulso corto (12 horas) y un periodo de acumulación medio (7 días).

Es importante tener en cuenta que en muchos casos los metabolitos secundarios son biosintetizados de manera modular en diferentes células y tejidos y que los intermediarios pueden ser transportados por el sistema vascular de la planta. Esto hace que la distribución de ^{13}C para los metabolitos secundarios pueda ser diferente a la esperada en el caso de los metabolitos primarios y que, por ejemplo, un metabolito secundario en las raíces pueda tener niveles de incorporación de ^{13}C superiores a los esperados. Debido a lo anterior, la dinámica de enriquecimiento de ^{13}C para un metabolito en particular debe establecerse de manera experimental (Bacher *et al.*, 2016b).

Por otro lado, el análisis de la distribución isotopológica de aminoácidos permite entender la distribución de metabolitos primarios de mayor complejidad que los azúcares. Como puede observarse en la Figura 2.7, la distribución de los aminoácidos enriquecidos es más compleja que la observada en el caso de la glucosa y pueden observarse valores entre el cero a casi el 20% de enriquecimiento en distintos órganos de la planta. Es importante observar que el mayor nivel de marcaje de aminoácidos se encuentra en hojas y tallos, lo cual parece confirmar la tendencia observada previamente con la glucosa, mientras que los niveles de marcaje en raíces son bajos, en todos los casos.

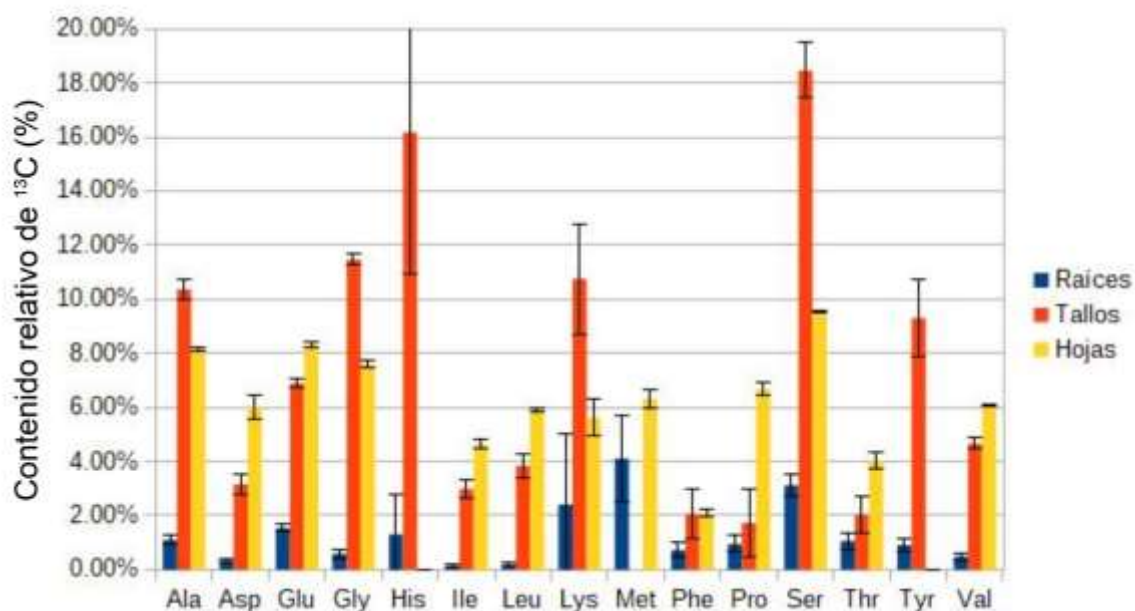


Figura 2.7. Niveles de enriquecimiento de distintos aminoácidos para las raíces, tallos y hojas de la muestra PAT-15.

El análisis de CG-EM por Monitoreo de Ion Simple (SIM, por sus siglas en inglés) del urechitol A contenido en las fracciones diclorometánicas obtenidas a partir de los extractos

metanólicos de las raíces de plantas tratadas con $^{13}\text{CO}_2$ permitió detectar diferentes grados de enriquecimiento en el contenido de ^{13}C en urechitol A (Figura 2.8). Luego del primer análisis realizado en muestras correspondientes a las fracciones diclorometánicas, no es posible observar una relación clara entre el tiempo de pulso o de acumulación con la incorporación de ^{13}C en urechitol A. Sin embargo, la dispersión en los valores es notablemente más baja en muestras a las cuales fueron aplicados periodos de pulso largos, indicando una posible mejor calidad en esos experimentos de marcaje con $^{13}\text{CO}_2$.

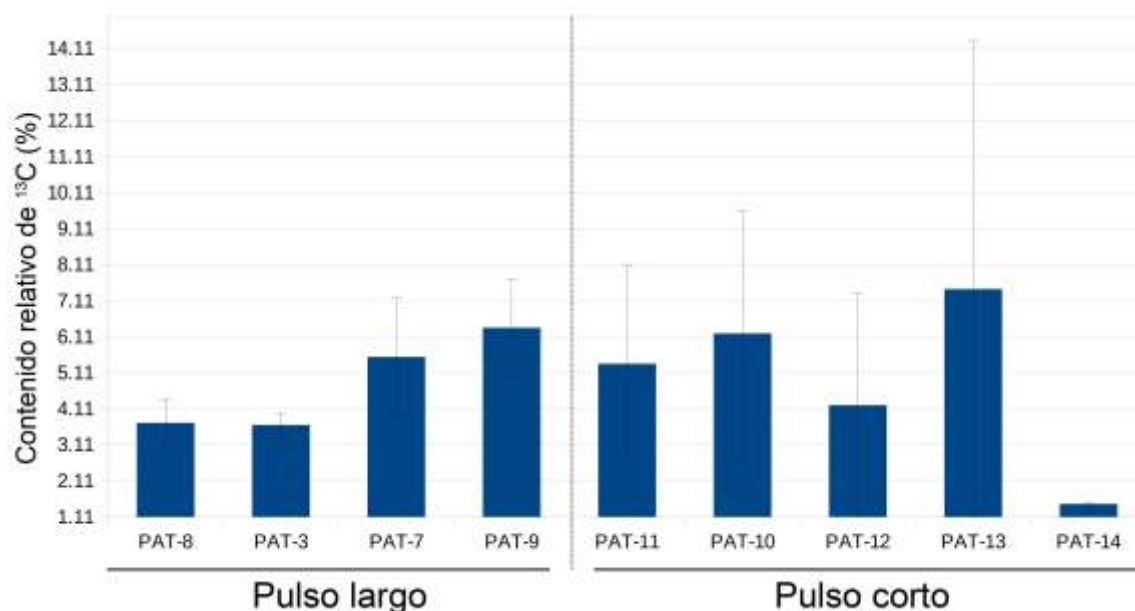


Figura 2.8. Enriquecimiento absoluto de ^{13}C en urechitol A, medido en fracciones diclorometánicas, luego de experimentos de pulso/acumulación con $^{13}\text{CO}_2$. Los datos fueron agrupados de acuerdo al tiempo de pulso con $^{13}\text{CO}_2$, definiéndose como pulso largo a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 16 horas y como pulso corto a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 12 horas.

Luego de la purificación de las fracciones diclorometánicas, las muestras semipuras de urechitol A fueron analizadas nuevamente por GC-EM para establecer el enriquecimiento absoluto en ^{13}C y la distribución isotopológica del urechitol A. La mayor pureza del urechitol A en estas muestras permitió obtener valores de enriquecimiento de ^{13}C más precisos, lo cual se puede apreciar en los menores valores de dispersión, con relación a aquellos obtenidos analizando las fracciones diclorometánicas (Figura 2.9).

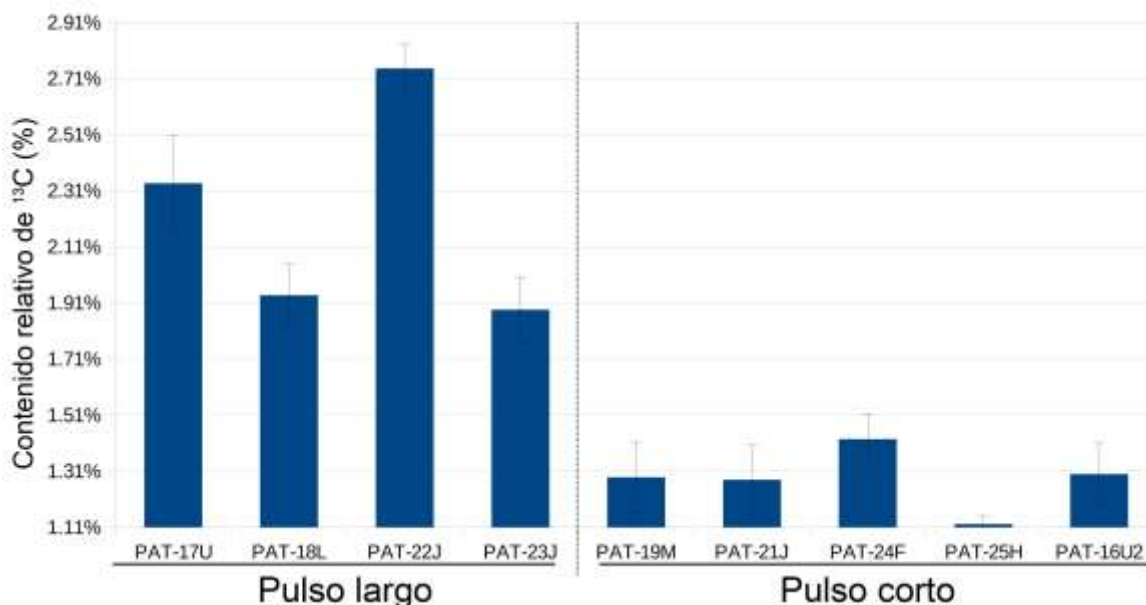


Figura 2.9. Enriquecimiento absoluto de ^{13}C en urechitol A en muestras semipurificadas, luego de experimentos de pulso/acumulación con $^{13}\text{CO}_2$. Los datos fueron agrupados de acuerdo al tiempo de pulso con $^{13}\text{CO}_2$, definiéndose como pulso largo a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 16 horas y como pulso corto a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 12 horas.

El análisis por monitoreo simple de iones del urechitol A contenido en las muestras semipurificadas y su comparación con la abundancia natural de ^{13}C en el urechitol A, muestra que el exceso absoluto de ^{13}C varía en un rango de 1.12 y 2.75% (Figura 2.9). Considerando que la abundancia natural del ^{13}C es de 1.11% puede decirse que en varias de las muestras analizadas la incorporación de la marca isotópica fue muy baja. Es notable, sin embargo, que aquellas muestras provenientes de plantas tratadas con pulsos largos de $^{13}\text{CO}_2$ tuvieron niveles de incorporación considerablemente mejores. En ese sentido, puede sugerirse que son necesarios pulsos largos (más de 15 h) para observar la incorporación de las marcas isotópicas en el urechitol A. Históricamente, estudios similares han aplicado pulsos de hasta 5 h para obtener buenos resultados de incorporación (Kutzner *et al.*, 2014; Bacher *et al.*, 2016), aunque debe considerarse que en la mayoría de esos casos se ha tratado de metabolitos secundarios extraídos a partir de las partes aéreas de las plantas, órganos en los cuales la incorporación puede ser más rápida que en las raíces. Adicionalmente, cada metabolito secundario puede presentar tiempos de biosíntesis particulares, por lo cual es difícil generalizar con respecto a los mejores tiempos de pulso o acumulación para lograr el marcaje isotópico ideal.

Por otro lado, era de esperarse que los experimentos de marcaje con pulsos múltiples (PAT-8 y PAT-10) permitieran obtener niveles de enriquecimiento mayores a los de pulso simple, ya que se presumía que cada pulso sucesivo permitiría rellenar el suministro total de fotosintatos con marca isotópica. Sin embargo, los resultados presentados aquí parecen indicar que la aplicación de pulsos múltiples no tiene una mayor incidencia y que el tiempo del pulso es un factor más importante. Esto se puede deducir al observar que PAT-8 (triple pulso) tuvo niveles buenos de incorporación, similares a los de pulso simple largo, pero PAT-10 (doble pulso) tuvo niveles de incorporación muy bajos, apenas por encima de la abundancia natural del ^{13}C . Es destacable, una vez más, que cada uno de los tres pulsos aplicados a PAT-8 fue largo (16 h) mientras que los pulsos para PAT-10 fueron cortos (12 h), resaltando que la cantidad de pulsos no es tan importante como la duración de los mismos.

En cuanto al análisis isotopológico, es de esperarse que el origen biosintético de las unidades isoprenoides por la vía del mevalonato aporten un considerable aumento en la abundancia relativa de los isotopólogos M+2, debido a que el IPP y el DMAPP se generan íntegramente a partir de unidades de acetil CoA que aportan dos átomos de ^{13}C cada uno. Por otro lado, se espera que la vía del metil-eritritol-3-fosfato (MEP) aporte un aumento considerable en las unidades M+3, además de los isotopólogos M+2 debido a que por esta vía el gliceraldehído (tres átomos de carbono) y el ácido pirúvico (aporta dos átomos de carbono) dan origen a las unidades isoprenoides. Con base en lo anterior, puede decirse que el origen biosintético por la vía MVA producirá un aumento significativo en isotopólogos M+2, mientras que el origen biosintético por la vía MEP permitirá observar un aumento en la proporción de isotopólogos M+3. Es importante señalar que, a pesar de la utilidad de predecir los patrones isotopológicos esperados, también deben considerarse algunos factores capaces de introducir diferencias entre lo predicho teóricamente y lo observado experimentalmente. En primer lugar, debe considerarse la abundancia natural del ^{13}C , la cual de manera probabilística generará un reducido número de isotopólogos M+2 y, en aún menor medida, isotopólogos M+3. Adicionalmente, debe tenerse en cuenta que durante la introducción de la perturbación isotópica utilizando $^{13}\text{CO}_2$ pueden generarse precursores que no hayan incorporado completamente la marca isotópica, por ejemplo: unidades isoprenoides provenientes de la vía MEP con dos átomos de ^{13}C en lugar de tres. Se ha demostrado en estudios previos que aun cuando la incidencia de este fenómeno es relativamente baja puede introducir un margen de error en los datos

obtenidos experimentalmente. El origen biosintético por la vía MVA de las unidades isoprenicas que dan lugar al ácido betulínico ha sido suficientemente establecido (Dewick, 2009). Recientemente se ha demostrado por experimentos de pulso/acumulación similares a los presentados en este estudio que el precursor directo del ácido betulínico, el lupeol, inicia su biosíntesis por la vía MVA (Peña-Rodríguez *et al*, 2014). Por este motivo la distribución isotopológica del ácido betulínico, posterior a la realización de experimentos de pulso/acumulación con $^{13}\text{CO}_2$, puede servir como un excelente parámetro para la comparación con la distribución isotopológica observada para las muestras de urechitol A. En la figura 2.10 puede observarse la gran diferencia en proporciones que existe entre la abundancia relativa de los isotopólogos M+2 con respecto a los isotopólogos M+3. Puede observarse además, la total concordancia entre los patrones isotopológicos del ácido betulínico y del acetato de lupeol, reportado previamente (Peña-Rodríguez *et al*, 2014). La presencia de una cantidad reducida de isotopólogos M+3 se explica por el aporte del ^{13}C natural y la probabilidad relativamente alta de que un isotopólogo M+2, producto del experimento de marcaje, pueda además contener un átomo de ^{13}C integrado de manera “natural”. Sin embargo, la proporción mucho mayor de isotopólogos M+2 indica claramente a un origen biosintético por la vía MVA del ácido betulínico.

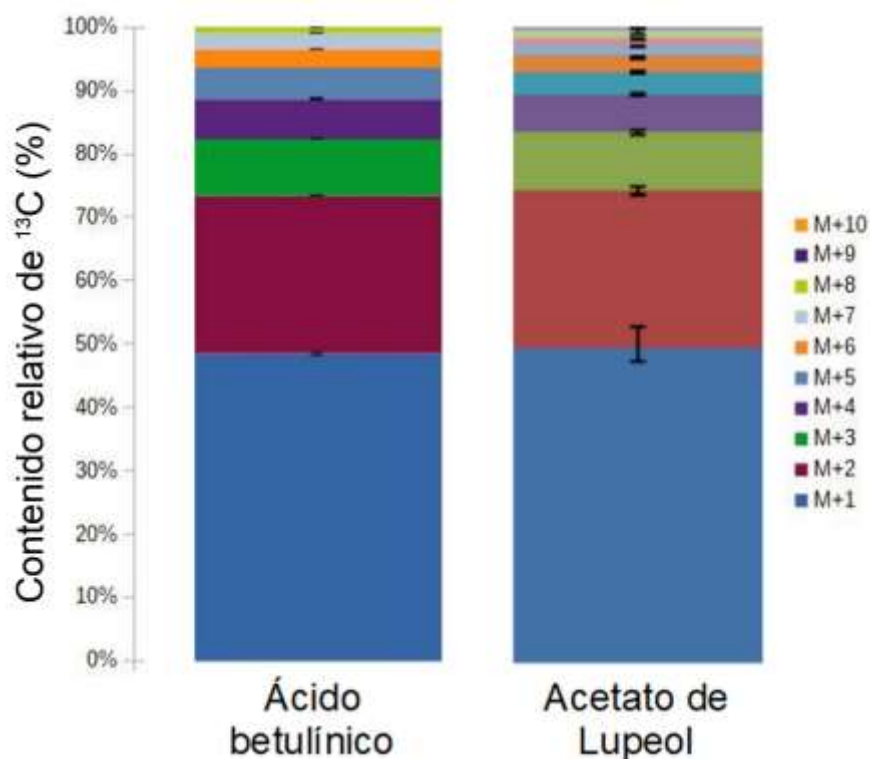


Figura 2.10. Distribución isotopológica del ácido betulínico y del acetato de lupeol (adaptado de Peña-Rodríguez *et al.*, 2014).

En el análisis de la distribución isotopológica del urechitol A (Figura 2.11) puede observarse a primera vista que las muestras obtenidas de pulsos largos presentan una distribución considerablemente más homogénea de la abundancia relativa de los isotopólogos que la que se puede observar para las muestras obtenidas por pulsos cortos. Esto refuerza la idea de que el marcaje isotópico con $^{13}\text{CO}_2$ fue exitoso en las muestras de pulso largo mientras que la distribución azarosa que se observa en las muestras de pulso corto sugiere que el exceso de ^{13}C observado en ellas se debe principalmente a variaciones aleatorias y no por consecuencia del experimento realizado.

Al observar a los primeros cinco iones (M+1 a M+5) se revela la presencia de una cantidad significativa de los isotopólogos M+3 y M+2 (Figura 2.11). Esto sugiere que la biosíntesis de las unidades isoprénicas que conforman al urechitol A no se originan por la vía MVA y, en cambio, podrían estar originadas a través de la vía MEP. Esto está en concordancia con lo observado en experimentos de marcaje isotópico del germacreno D (propuesto precursor del urechitol A) en los que se ha visto que las unidades isoprénicas que lo conforman tienen la vía MEP como origen biosintético (Steliopoulos *et al.*, 2002).

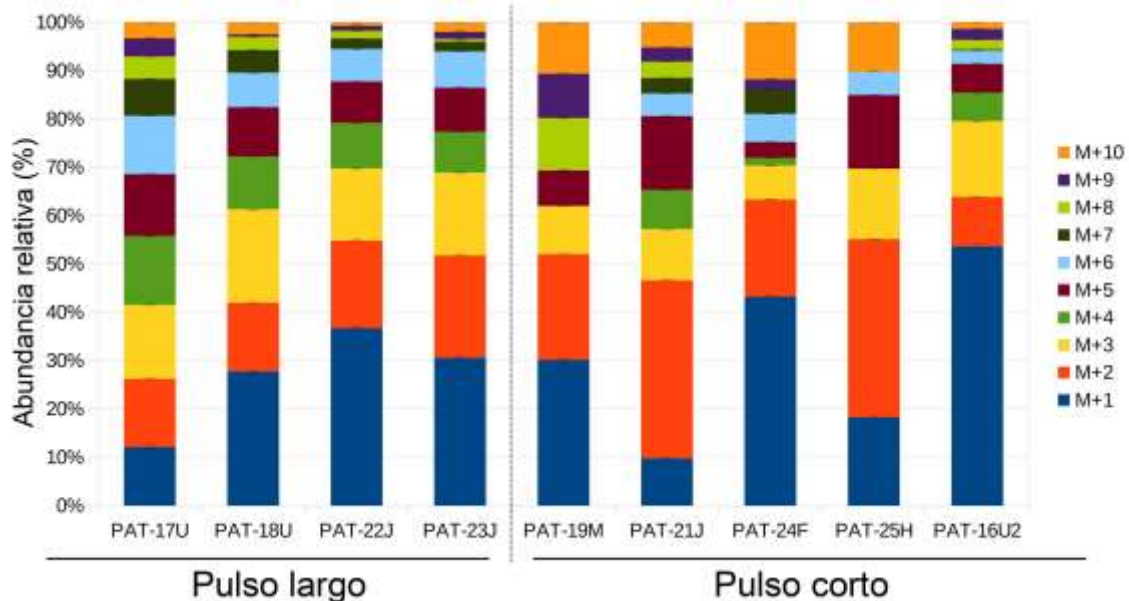


Figura 2.11. Distribución de isotopólogos de urechitol A. Los datos fueron agrupados de acuerdo al tiempo de pulso con $^{13}\text{CO}_2$, definiéndose como pulso largo a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 16 h y como pulso corto a un periodo de exposición a $^{13}\text{CO}_2$ de aproximadamente 12 h.

Sin embargo, no puede explicarse toda la distribución isotopológica por el análisis de CG-EM y, sobre todo, no es posible asignar las posiciones en las cuales han sido incorporadas las marcas de ^{13}C , para esto es necesario el análisis por resonancia magnética Nuclear de carbono (^{13}C -RMN).

En la Figura 2.12 se pueden observar señales seleccionadas de ^{13}C -RMN obtenidas para el ácido betulínico marcado. En la figura se indican las señales satélite producidas por el acoplamiento ^{13}C - ^{13}C a corta distancia y que indican el origen biosintético por la vía MVA del ácido betulínico, coincidiendo con lo reportado previamente para el 3'-hidroxi-estearato de lupeol.

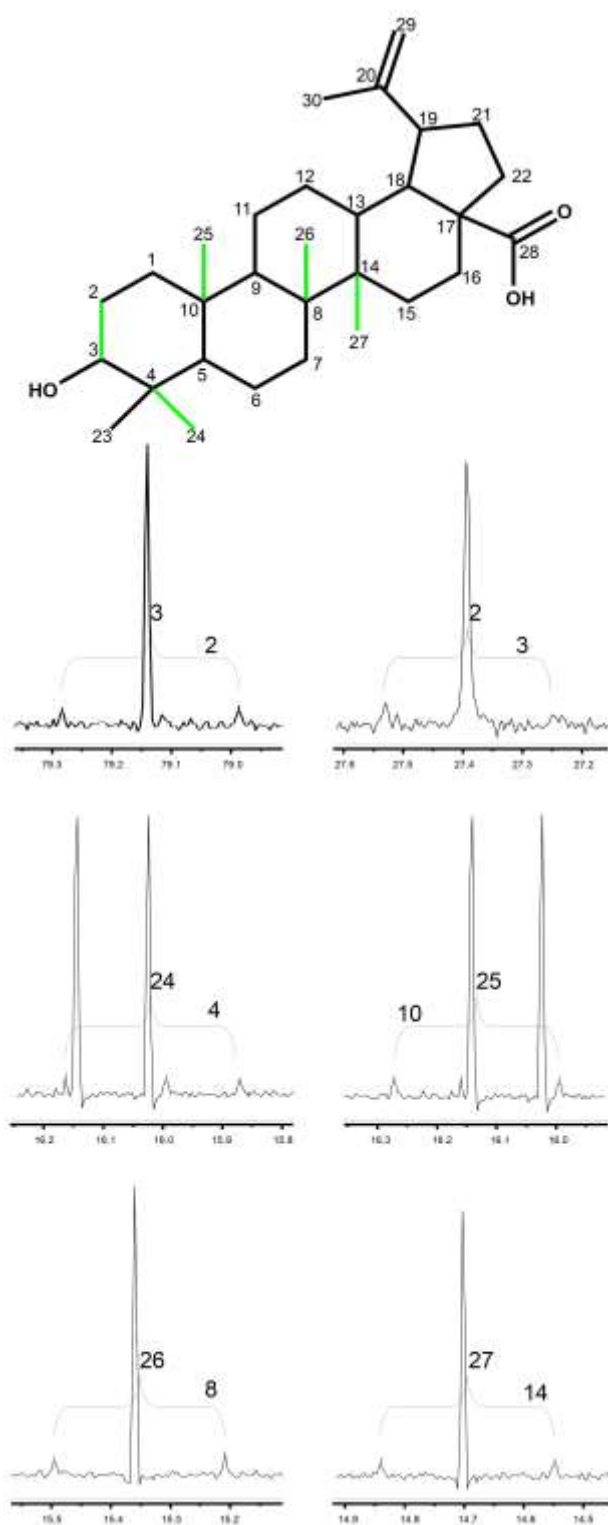


Figura 2.12. Estructura del ácido betulínico y señales selectas de su espectro de ^{13}C -RMN. Las líneas verdes indican los pares C-C cuyos acoplamientos fue posible observar en el espectro de ^{13}C -RMN.

Con el fin de obtener una cantidad suficiente de urechitol A marcado para su análisis por ^{13}C -RMN, se reunieron las muestras formando dos grupos (pulso largo y pulso corto). A partir de las muestras reunidas se purificó el urechitol A por cromatografía de capa delgada preparativa y se obtuvieron 0.6 mg (PAT-41D) y 0.7 mg (PAT-41M) de urechitol A puro, respectivamente. Si bien fue posible observar las señales características del urechitol A por ^{13}C -RMN (Figura 2.13), la baja cantidad del producto analizado no permitió la distinción de las señales satélite de los acoplamientos carbono-carbono esperados para los productos de marcaje isotópico.

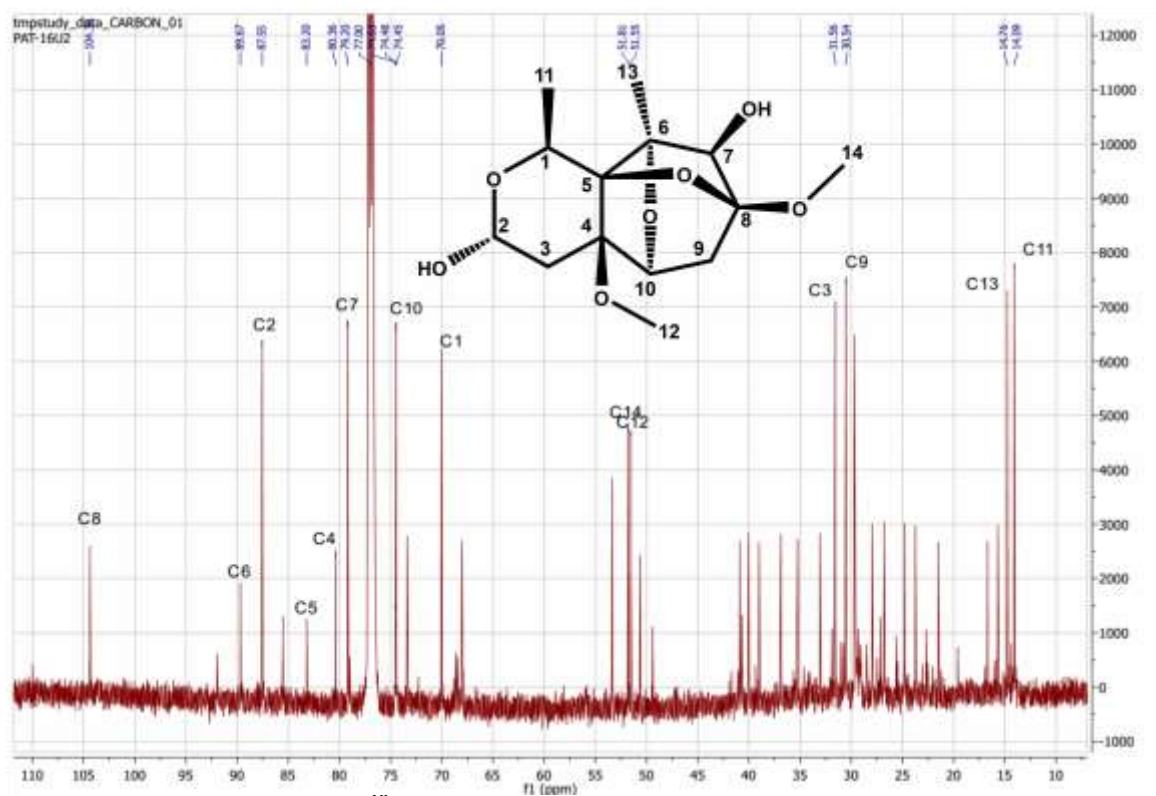


Figura 2.13. Espectro de ^{13}C -RMN de urechitol A semipuro. Las señales etiquetadas corresponden a señales debidas al urechitol A.

2.4. CONCLUSIONES

Por primera vez ha sido posible el marcaje isotópico del urechitol A. Fue posible incorporar marcas de ^{13}C al urechitol A por medio de experimentos de pulso/acumulación utilizando $^{13}\text{CO}_2$ como marcador universal.

Los niveles más bajos de enriquecimiento de ^{13}C en los azúcares y aminoácidos observados en las muestras de las raíces de las plantas analizadas, sugiere que la distancia existente entre los órganos fotosintéticamente activos, como hojas, y las raíces incide en los niveles de marcaje isotópico de metabolitos primarios. Esto se puede deber a que el tiempo necesario para que la marca isotópica, introducida por el $^{13}\text{CO}_2$ alcance el metabolismo en las raíces es prolongado, cuando se compara con las hojas. Al observar los niveles de incorporación de ^{13}C en el urechitol A, las muestras expuestas a pulsos cortos de $^{13}\text{CO}_2$ resultaron en niveles muy bajos de incorporación, mientras que todos los experimentos de pulso largo resultaron en niveles significativos de incorporación de ^{13}C . En ese sentido, el tiempo de acumulación posterior al pulso con $^{13}\text{CO}_2$ no parece tener una incidencia significativa en los niveles de incorporación de ^{13}C . Esto parece indicar que para este caso particular es necesaria la aplicación de pulsos largo de $^{13}\text{CO}_2$ para obtener moléculas de urechitol A marcadas con ^{13}C .

El análisis de la distribución de isotopólogos del urechitol A y el ácido betulínico sugiere que ambos provienen de rutas biosintéticas diferentes. El ácido betulínico marcado con ^{13}C muestra un patrón de distribución isotopológica idéntico al del lupeol, su precursor biosintético. Este patrón está caracterizado por una alta proporción de los isotopólogos M+1 y M+2, mientras que el isotopólogo M+3 es relativamente poco abundante. Adicionalmente, el análisis isotopomérico por ^{13}C -RMN indica el acoplamiento de señales de manera muy similar a la observada para el lupeol, confirmando así el origen biosintético del ácido por la vía MVA, seguido por la ruta biosintética de los lupanos. Por otro lado, el análisis de la distribución isotopológica del urechitol A demuestra una mayor abundancia relativa del isotopólogo M+3, al compararse con las abundancias de los isotopólogos M+2 y M+1. Esta mayor presencia del isotopólogo M+3 es explicable si se considera que la ruta biosintética que da origen a las unidades isoprénicas del urechitol A provienen de la vía MEP. Debido a la reducida cantidad obtenida de urechitol A marcado no es posible confirmar esta hipótesis por medio de análisis de RMN, pero es de esperarse que futuros experimentos, con la obtención de una mayor cantidad de urechitol

A marcado, puedan establecer los patrones isotopoméricos para el urechitol A y así confirmar el origen biosintético de sus unidades C5.

CAPITULO III

LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LA ENREDADERA TROPICAL *PENTALINON ANDRIEUXII* (APOCYNACEAE) VIA *AGROBACTERIUM* *RHIZOGENES* PRODUCE PLANTAS CON UNA MAYOR CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE TERPENOIDES

3.1. INTRODUCCIÓN

La modificación genética utilizando *Agrobacterium rhizogenes* ha sido una importante herramienta biotecnológica para el mejoramiento de la producción de metabolitos secundarios durante las últimas cuatro décadas. La enredadera tropical *Pentalinon andrieuxii*, una planta nativa de la península de Yucatán utilizada en la medicina tradicional maya para el tratamiento de las lesiones causadas por la leishmaniasis, ha demostrado la capacidad de producir un número importante de metabolitos secundarios, entre ellos el triterpeno ácido betulínico y el novedoso tri-nor-sesquiterpenoide urechitol A. En este estudio se reporta el uso de *A. rhizogenes* para generar 14 líneas de plantas transformadas de *P. andrieuxii* que demuestran una mayor capacidad de producción de los terpenoides ácido betulínico y urechitol A. Todas las líneas transgénicas fueron regeneradas a partir de cultivos *in vitro* de raíces peludas obtenidos previamente a través de la infección de explantes de hojas e hipocotilos con la cepa ATCC 15834 de *A. rhizogenes*. La inserción de los transgenes *rolA*, *rolB* y *rolC* fue confirmada por la amplificación de los mismos por PCR. El ácido betulínico y el urechitol A fueron detectados y cuantificados utilizando métodos estandarizados de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR/HPLC, por sus siglas en inglés) y de cromatografía de gases (CG), respectivamente. Se pudieron observar aumentos significativos en el contenido de estos terpenoides, de más de 11 veces para el ácido betulínico y hasta tres veces para el urechitol A, en algunas de las líneas transgénicas al ser comparadas con el control silvestre.

Una de las principales limitantes en el estudio de la biosíntesis del urechitol A es el bajo contenido del mismo en las plantas de tipo silvestre. Esto ha resultado en la obtención de cantidades insuficientes de urechitol A marcado con marcadores isotópicos para el desarrollo de experimentos espectrométricos avanzados que permitan elucidar su origen biosintético. Por lo tanto, las nuevas líneas transgénicas presentadas en este estudio

representan herramientas prometedoras para estudios futuros que permitan avanzar en el conocimiento del origen biosintético de terpenoides en *P. andrieuxii*, especialmente de los inusuales urechitoles.

Manuscrito “Genetic transformation of the tropical vine *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae) via *Agrobacterium rhizogenes* produces plants with an increased capacity of terpenoid production” sometido a la revista *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*.

Autores: Mickel Randolph Hiebert-Giesbrecht, Elidé Avilés-Berzunza, Gregorio Godoy-Hernández, Luis Manuel Peña-Rodríguez

3.2. GENETIC TRANSFORMATION OF THE TROPICAL VINE *Pentalinon andrieuxii* (APOCYNACEAE) VIA *Agrobacterium rhizogenes* PRODUCES PLANTS WITH AN INCREASED CAPACITY OF TERPENOID PRODUCTION

3.2.1. INTRODUCTION

The perennial vine *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) b.f. Hansen & Wunderlin (Apocynaceae), known commonly as “contrayerba”, is a native plant of the Yucatan peninsula that occurs from southern Florida to Nicaragua (Morales 2009). The root of the plant is used in Mayan traditional medicine for the treatment of various medical afflictions, most particularly the lesions resulting from cutaneous leishmaniasis (Pulido and Serralta 1993). Over the past two decades, phytochemical studies of *P. andrieuxii* have reported the presence of trinorsesquiterpenoids (Yam-Puc *et al.* 2009), triterpenoids (Domínguez-Carmona *et al.* 2010; Yam-Puc *et al.* 2013), steroids (Yam-Puc *et al.* 2012b), as well as coumarins and pregnanes (Pan *et al.* 2012). Of particular interest is the presence of the bioactive triterpenoid betulinic acid (Figure 1) in the leaves of *P. andrieuxii* (Domínguez-Carmona *et al.* 2010), and the structurally-novel trinorsesquiterpenoid urechitol A (Figure 1) in the root of the plant (Yam-Puc *et al.* 2009).

While betulinic acid has been reported from a significant number of plant sources and is well known for its promising anti-HIV and anticancer activities (Ali-Seyed *et al.* 2016; Li *et al.* 2016), to date urechitol A has only been reported to occur in the roots of *P. andrieuxii* and is not known to show any significant biological activity (Sumiya *et al.* 2010). It has been proposed that the peculiar structure of urechitol A originates from a carbon skeleton belonging to a new group of tri-nor-sesquiterpenoids (Yam-Puc *et al.* 2009), with unknown biological functions in the plant and a still to be established biosynthetic origin. A number of strategies have been explored in an attempt to improve terpenoid production in *P. andrieuxii* and assist in establishing the biosynthetic origin of the campechane skeleton of urechitol A. These included the *in vitro* induction of callus cultures from leaves, stems and roots of *P. andrieuxii*, the *in vitro* generation of root cultures, and the transformation of different plant organs and tissues with *Agrobacterium tumefaciens* (Yam-Puc *et al.* 2012a) and *A. rhizogenes* (Burgos-May *et al.* 2018). However, none of these *in vitro* plant tissue culture strategies resulted in the production of urechitol A. Even though these results suggested that the whole plant is necessary for its biosynthesis, ¹³CO₂ isotopic labeling experiments on

whole plants of *P. andrieuxii* also proved unsuccessful at producing labeled urechitol A (Peña-Rodríguez *et al.* 2014).

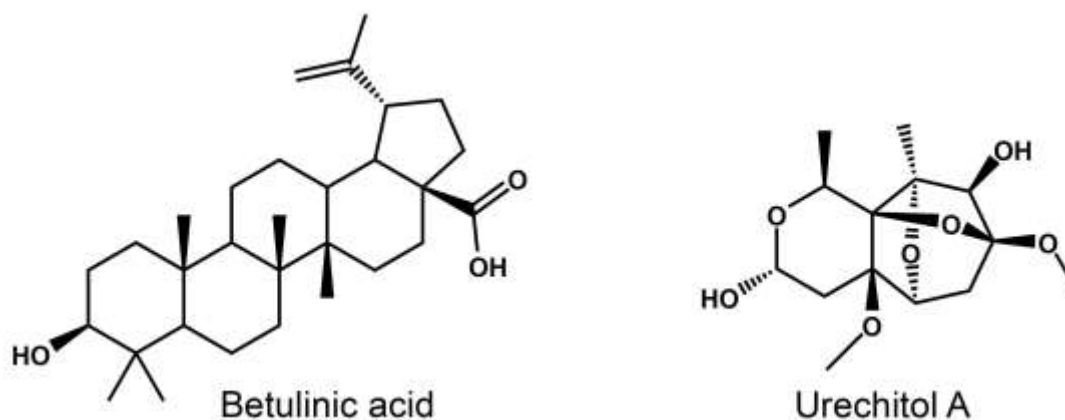


Figure 3.1. Chemical structures of betulinic acid and urechitol A.

Plant transformation via *A. rhizogenes* has proven to be a strategy with great potential to increase the production of secondary metabolites in different plant species (Georgiev *et al.* 2012). This soil bacterium is well known for the hairy root syndrome, a plant disease characterized by the appearance of highly branched roots at the infection site (Riker *et al.* 1930). The infection process is mediated by the insertion of a group of oncogenes from *A. rhizogenes* into the genome of the plant, via a bacterial root-inducing plasmid or *Ri* plasmid (Chilton *et al.* 1982). The *Ri* plasmid contains a particular family of genes, known as *rol* genes, that have been linked to important changes in plant morphology and plant secondary metabolism (Pavlova *et al.* 2016). The use of *A. rhizogenes*' oncogenes for biotechnological purposes has thus been of great interest towards the development of plant or tissue lines with improved productivity traits (Matveeva and Sokornova 2018). Recently, it has been reported that transformation of *Artemisia annua* plants with the *rolB* gene generated genetically-transformed plant lines showing a nine-fold increase in their production of artemisinin (Dilshad *et al.* 2015); similarly, callus cultures of *Rubia cordiflora* transformed with individual or combined *rol* genes also showed an increase in anthraquinone production (Shkryl *et al.* 2008). Here we report the use of *A. rhizogenes* to generate transformed *P. andrieuxii* plants and on the accumulation of betulinic acid and urechitol A among the transgenic lines.

3.2.2. MATERIALS AND METHODS

3.2.2.1. Plant material

Seeds of *P. andrieuxii* were collected from a wild population of plants located in the state of Campeche, Mexico (19°46'51.9"N 90°30'07.2"W). Collected seeds were surface decontaminated by immersion in 5% Extran detergent (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) for five min, followed by a five-min immersion in a 70% ethanol solution. Seeds were then submerged in a 3% sodium hypochlorite solution (prepared by diluting commercial bleach with ultra-pure water) for 20 min and washed thoroughly with sterile distilled water afterwards. Disinfected seeds were germinated in flasks on a modified PC-L2 medium (Phillips and Collins 1979; without growth regulators, 20 mL medium per flask) at pH 5.5, supplemented with 2.5% sucrose and 1% agar. Seeds were kept on this medium at 25 °C ± 2 °C, in the dark, for two wk, and under continuous light (40 to 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$) for two mo after germination. Sections of hypocotyls and leaves were taken as explants for the genetic transformation procedures. The pH of all media used in this study was adjusted prior to sterilization. For semisolid media, agar was added after adjusting the pH. All media were sterilized in an autoclave at 121°C for 15 min. When needed, antibiotics, inductors and growth regulators were syringe sterilized and added to the growth medium after allowing it to cool down to room temperature.

3.2.2.2. *Agrobacterium rhizogenes* strain and genetic transformation

Explants (leaves and hypocotyls) of *P. andrieuxii* were infected with *A. rhizogenes* strain ATCC 15834, provided by Dr. María Luisa Villarreal-Ortega of the Laboratory of Medicinal Plant Biotechnology, a part of the Biotechnology Research Center of the University of the State of Morelos in Cuernavaca, Mexico. The bacterium was cultured in YM medium (500 mg L⁻¹ K₂HPO₄, 200 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 100 mg L⁻¹ NaCl, 1000 mg L⁻¹ mannitol, 400 mg L⁻¹ yeast extract, at pH 7.2, without antibiotics) for 49-h at 200 rpm on a shaker (Innova 2100, New Brunswick Scientific, Connecticut, USA) under darkness. Ten mL of YM medium was then inoculated with 200 μL of the bacterial culture and incubated for 24-h (under the same conditions described above) and subsequently diluted 1:1 (v:v) with YM medium and 10 μL 200 mM acetosyringone added and incubated for another 5-h under the same conditions. Approximately 1 cm sections of 71 leaf and 98 hypocotyl explants, obtained from two-mo-old *in vitro* grown *P. andrieuxii* plants were inoculated with *A. rhizogenes* (OD₆₀₀ = 0.1), vacuum applied for 20 min, explants dried on sterile paper and placed individually in Petri dishes containing semisolid modified PC-L2 medium and

incubated for five-d in the dark at $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Following co-cultivation explants were transferred to flasks containing semisolid modified PC-L2 medium containing 500 mg L^{-1} cefotaxim, and kept under continuous light to promote organogenesis at $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Negative controls consisted of leaf and hypocotyl explants not exposed to *A. rhizogenes* but kept under identical conditions as co-cultured explants. After reaching a length of approximately 5 cm, roots were excised and individually transferred to separate flasks containing liquid modified PC-L2 culture medium containing 500 mg L^{-1} cefotaxim, and kept on a shaker (95 rpm, Innova 2100, New Brunswick Scientific, Connecticut, USA), at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ under continuous light ($40\text{ to }50\text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$). Root growth rate indexes (gri), obtained using the equation $(\text{final fresh weight} - \text{initial fresh weight}) / \text{initial fresh weight}$, were calculated; four lines with the highest growth rates (gri values of approximately 5.5) were used in further studies. Selected hairy root lines were sub-cultured every 20 d in fresh liquid modified PC-L2 culture medium containing 500 mg L^{-1} cefotaxim. For subcultures within each transgenic line, three to four segments of the roots were transferred individually to separate flasks containing new medium, as described above.

3.2.2.3. Regeneration of transformed plants and adaptation to *ex-vitro* conditions

Shoots appeared spontaneously after six mo of maintaining the hairy root cultures *in vitro*. After reaching approximately 2 cm in length, shoots were dissected and transferred to fresh semisolid PC-L2 medium, containing $1\text{ }\mu\text{M}$ indole butyric acid (IBA) to induce root formation and maintained under continuous light for four wk. Control plants were propagated *in vitro* under the same conditions as transformed plants. Plants were subsequently removed from the semisolid PC-L2 medium, washed thoroughly and transferred to pots filled with sterile soil. Each plant pot was covered with a plastic film and transferred to a growth chamber (Figure 2). The plastic film was daily and progressively perforated to allow for a gradual adaptation of the plants to *ex vitro* conditions. After a wk, the plastic films were removed and the plants were allowed to grow at room temperature, under photoperiod conditions of 16-h of light ($15.81\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$)/8-h of darkness, and watered every other d during a four-y period, until tissue collection for extraction.

3.2.2.4. Genomic DNA extraction and PCR amplification of genes *rolA*, *rolB* and *rolC*

Total genomic DNA was isolated from leaves of genetically-transformed *P. andrieuxii* plant lines using the method described by Tapia-Tussell *et al.* (2005) and diluted to a final concentration of $50\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$. Polymerase chain reaction (PCR) was used to confirm the presence of the *rolA*, *rolB* and *rolC* genes (Figure S1); PCR reactions were performed in

25 μ L reaction volumes containing 80 ng of genomic DNA, 1 \times PCR buffer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 1.5 mM MgCl₂, 5% Dimethyl sulphoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.2 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate (DNTP), 1 μ M of each primer and 1 U Taq DNA Polymerase recombinant (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Plasmid DNA extracted from *A. rhizogenes* strain ATCC 15834 was used as the positive control, while genomic DNA extracted from a wild-type *P. andrieuxii* plant was used as negative control. DNA amplification was performed in a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, California, USA) and the program consisted of an initial denaturing step at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 1 min of denaturation at 94 °C, 1 min of annealing at 50 °C for *rolA*, and 55 °C for *rolB* and *rolC* and 1 min of extension at 72 °C, and a final extension step of 72 °C for 7 min. PCR products were separated by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels and visualized by ethidium bromide staining.

3.2.2.5. Extraction of plant material

Selected plants were individually removed from their pots and a portion (approximately 50 %) of the root mass collected, washed, frozen, freeze-dried and stored in individually labeled paper bags. Similarly, approximately 50 % of healthy leaves from each plant were collected, frozen, freeze-dried and stored in individually labeled paper bags. The freeze-dried plant material was ground to a powder using a mortar and a portion (approximately 500 mg) of the powder was exactly weighed and extracted with 100 mL of methanol (Conquimex, Ecatepec de Morelos, Mexico; distilled in the laboratory) for 30 min in an ultrasonic bath. The extraction solvent was filtered (Whatman No. 1 filter paper) and then evaporated under reduced pressure using a Rotavapor[®] R-300 system (Büchi Labortechnik AG, Switzerland) at 35 °C to produce the corresponding crude extract, which was then extracted with dichloromethane (ACS grade, Fermont, Monterrey, México) for 30 min in an ultrasonic bath (Branson CPXH 5800, Branson Ultrasonics Corp., Connecticut, USA). The extraction solvent was filtered and evaporated under reduced pressure at 35 °C to yield the dichloromethane extract, which was kept at 4 °C until analysis.

3.2.2.6 Chromatographic analyses

3.2.2.6.1. Sample preparation

Plant samples for gas chromatography analyses were dissolved in dichloromethane, with the aid of an ultrasonic bath (Branson CPXH 5800, Branson Ultrasonics Corp., Connecticut, USA), to a final concentration of 10 mg mL⁻¹. For HPLC-UV analyses

samples were dissolved in HPLC-grade methanol to a final concentration of 10 mg mL⁻¹ and filtered through 5 µm syringe filters (Merck-Millipore, Massachusetts, USA) prior to injection.

3.2.2.6.2. Detection of urechitol A chromatographic profiles.

An authentic sample of pure urechitol A, isolated from a root extract of *P. andrieuxii* following the procedure reported by Yam-Puc *et al.* (2009), was used as reference standard. Identity and purity of the urechitol A sample were confirmed by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) analysis (Figure S1), using an Agilent 6890 gas chromatograph coupled to an Agilent 5973 mass spectrometer. Data were acquired and processed using the Agilent ChemStation software (Agilent Technologies, Palo Alto CA, USA) and an HP-5ms capillary column [30 m × 0.25 mm internal diameter (i.d.)] coated with 0.25 µm film of 5% phenyl methyl siloxane (Agilent technologies, Palo Alto, CA, USA). The column temperature was set at an initial temperature of 180 °C and held for 5 min for injection, then increased at a ratio of 5 °C min⁻¹ to 300 °C and held for 10 min for a total run time of 39 min. Split injection (3 µL) was set to a split ratio of 50:1 and high-purity helium was used as carrier gas at 1.5 mL min⁻¹ flow-rate. The electron-impact (EI) spectrometer was operated at an ionization energy of 70 eV and the scan range was set to 50 to 600 amu. The presence of urechitol A in the different extracts was detected by comparing the GC-MS chromatographic profiles of the different samples with the chromatographic profile of the reference standard.

3.2.2.6.3. Quantification of urechitol A by GC-FID.

Quantitative analyses were carried out using a Varian 430-GC (Varian, Palo Alto CA, USA) gas chromatograph equipped with a Varian PAL autosampler (Varian, Palo Alto CA, USA). Separations were carried out using an HP-5ms column (25 m × 0.32 mm i.d. × 0.52 µm film thickness; stationary phase 100% dimethylpolysiloxane polymer; Agilent Technologies, Palo Alto CA, USA). The GC conditions were set as follows: injector, splitless; injection volume: 1.0 µL; carrier gas: N₂; flow rate: 1.0 mL min⁻¹; split: off. Oven temperature program was set at 150 °C for 3 min, heating at a 9.3 °C min⁻¹ rate to 260 °C, held for 5 min; for leaves: 150 °C for 3 min, heating at a 9.3 °C min⁻¹ rate to 260 °C, and held for 15 min. Injector and flame ionization detection (FID) temperatures were set at 250 °C and 280 °C, respectively. FID conditions: sampling frequency: 12.5 Hz; the data were processed using the Galaxie software (Varian, Palo Alto CA, USA). A calibration curve was prepared using pure urechitol A isolated from a root extract of *P. andrieuxii*. The standard

solutions were injected in duplicate and the curve was constructed using five concentrations (0.01 to 0.1 mg mL⁻¹). The resulting curve was linear ($R^2 = 0.996$) in the concentration interval used.

3.2.2.6.4. Detection and quantification of betulinic acid in HPLC-UV (Figure S1) chromatographic profiles.

Betulinic acid was detected and quantified in the HPLC-UV chromatographic profiles by comparing the retention time of an authentic standard with that in the profiles of the different samples analyzed using a Waters HPLC chromatograph, equipped with a Waters 600 binary pump, Waters 717 plus autosampler, Waters 2487 dual-wavelength ultra-violet detector (UV), and the Empower Pro © software (2002, Waters, Milford, MA, USA). Samples and reference standard were dissolved in HPLC-grade methanol (J. T. Baker, New Jersey, USA). The analytical method (modified from de Oliveira *et al.* 2002) was developed using a Waters Spherisorb® ODS2 RP-18 column (4.6 x 250 mm, 5 µm) (Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase consisted of 90% acetonitrile (J. T. Baker, New Jersey, USA) (solvent A) and 10% ultrapure water (Simplicity®, Merck-Millipore, Massachusetts, USA) (solvent B). The flow rate was set to 1.0 mL min⁻¹, the injection volume to 20 µL, the column temperature was maintained at 25 °C, and the detection was carried out at λ 210 nm. For HPLC quantitative analyses a calibration curve was prepared using a commercial sample of betulinic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Figure S1). The standard solutions were injected in duplicate and the curve was constructed using six concentrations (0.01 to 0.5 mg mL⁻¹). The resulting curve was linear ($R^2 = 0.990$) in the concentration interval used.

3.2.2.7. Statistical analyses

Statistically significant differences were calculated using analysis of variance (ANOVA) in R version 3.5.3. Means were compared using the Tukey's HSD post-hoc test with a level of significance of $P = 0.05$. The statistical package lawstat was used to perform the Levene test for homoscedasticity and the Shapiro-Wilks test (Agricolae statistical package) was used to test for normal distribution of the data.

3.2.3. RESULTS AND DISCUSSION

Transformation of *P. andrieuxii* explants with *A. rhizogenes* generated a total of 36 lines of *in vitro* hairy root cultures; nine lines originated from leaf explants and 27 from hypocotyl. The appearance of roots on the surface of explants was observed approximately four wk after the transformation procedure, with a total efficiency of 8.45 % and 22.45 % for leaf and hypocotyl explants, respectively. A total of 14 plant lines were obtained from shoots that developed spontaneously while maintaining the different hairy root cultures *in vitro*; PCR analysis of all regenerated transgenic plants demonstrated the presence of the *roIA* (approximately 250 bp), *roIB* (approximately 650 bp) and *roIC* (approximately 500 bp) genes (Figure S2). Even though it has been reported that plants transformed with *rol* genes can show various abnormalities in their phenotypes (e.g. dwarfed plants, wrinkled leaves, more abundant roots, etc.) (Pavlova *et al.* 2016), the transgenic plants obtained during this study did not show morphological differences when compared to the wild type control plants kept under the same conditions (Figure 3.2), indicating that the insertion of *rol* genes had no observable effect on the morphology or development of the transgenic plants. These findings coincide with literature reports describing that transformation of plant tissues with a *rolABC* array, as is the case in this investigation, reduces the negative effects on tissue growth observed when individual *rol* genes are introduced, while maintaining an increased level of secondary metabolite production (Shkryl *et al.* 2008).

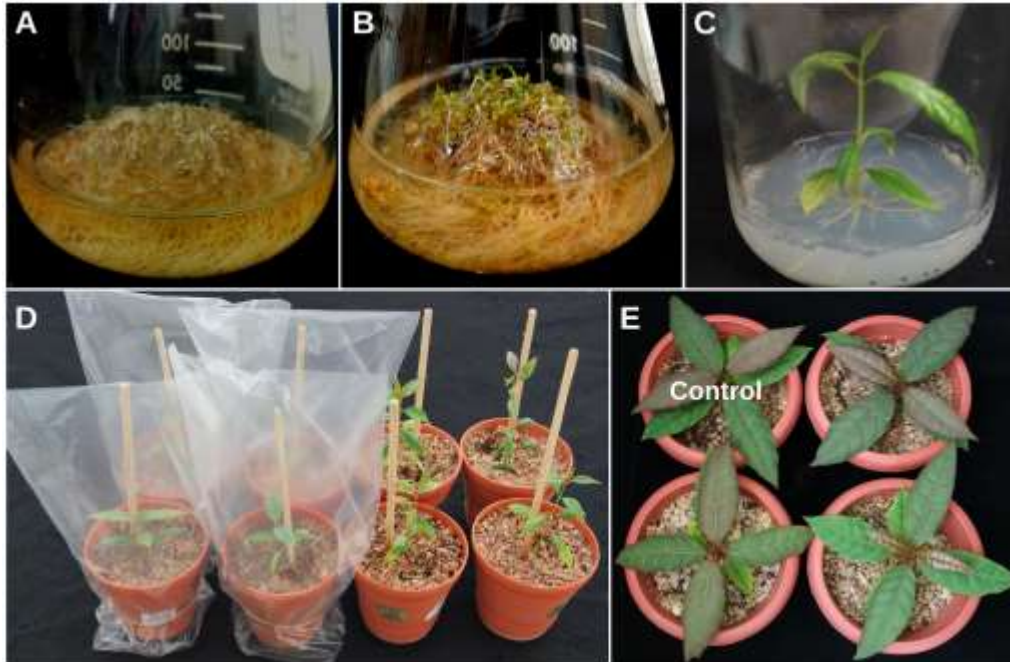


Figure 3.2. Different stages of *P. andrieuxii* plant regeneration. **(A)** *P. andrieuxii* hairy root culture; **(B)** spontaneous shoot development on hairy root cultures; **(C)** *P. andrieuxii* regenerated plantlet rooted *in vitro*; **(D)** acclimation of *in vitro* plants to *ex vitro* conditions; **(E)** transformed *P. andrieuxii* plants compared to the wild type control plant.

It is interesting to mention that while both the transgenic and wild type control plants showed the expected transition from young to intermediate growth stages (Hiebert-Giesbrecht *et al.* 2018), no flowering was observed in any of the plants during their four-year period in the growth chamber. These observations might be explained by the fact that light and temperature differences between natural and controlled conditions can have an important influence on plant development and morphology (Carvalho *et al.* 2016; Bian *et al.* 2015; Qiao *et al.* 2019). These results also agree with recent unpublished results from our group which show that wild plants of *P. andrieuxii* kept in shaded conditions develop slower than those exposed to direct sunlight.

Chromatographic analyses of the dichloromethane extracts from leaves and roots of transformed plants showed that metabolites betulinic acid and urechitol A followed the same spatial distribution reported recently for non-transgenic plants, namely that urechitol A occurs exclusively in the roots while betulinic acid is only found in the leaves (Hiebert-Giesbrecht *et al.* 2016). However, the levels of betulinic acid and urechitol A in the leaves

and roots, respectively, of the transformed plants varied significantly when compared to those observed in the leaves and roots of the wild type control plant (Figure 3.3).

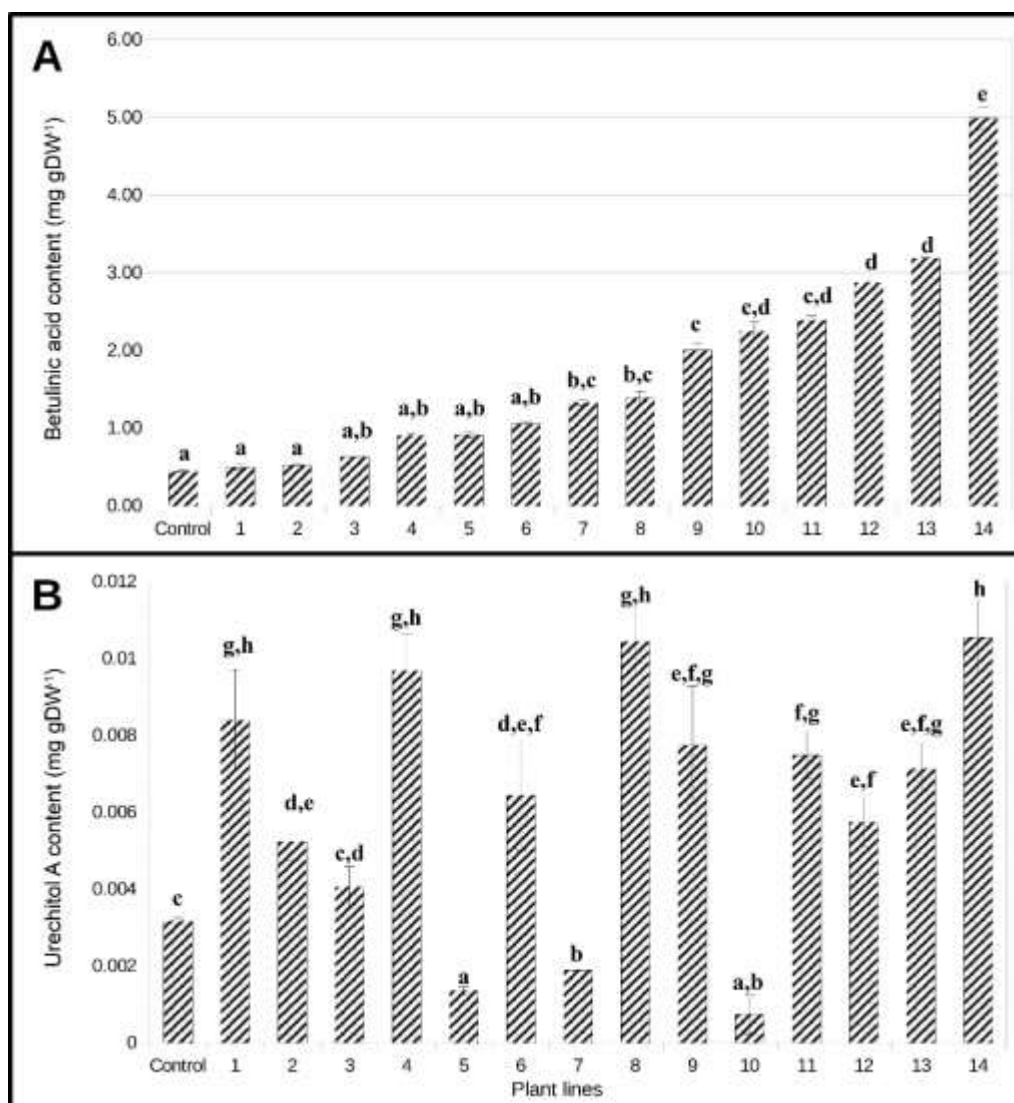


Figure 3.3. Content of betulinic acid in leaves (A) and urechitol A in roots (B) of transformed *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) b.f. Hansen & Wunderlin plants. Bars represent mean values \pm standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences ($p \leq 0.05$).

The content of betulinic acid (0.49 to 4.99 mg g Dry Weight⁻¹ (gDW)) in the leaf extracts of the transformed plants (Table S1) was significantly higher [up to 11.37 times (Figure 3A)] than that of the wild type control plants (0.44 mg gDW⁻¹) kept under the same controlled conditions, and higher than those recently found in plants growing in the wild (0.5 to 0.7

mg gDW⁻¹) (Hiebert-Giesbrecht *et al.* 2016). These results indicate that the transformation of *P. andrieuxii* with *A. rhizogenes* disrupts the mechanism regulating the production of betulinic acid and are in agreement with studies describing the effects of the introduction of *rol* genes in the production of secondary metabolites in plants and plant cell cultures (Bulgakov *et al.* 1998; Bonhomme *et al.* 2000; Bulgakov 2008).

Alternatively, analysis of root extracts of the transformed *P. andrieuxii* plants showed that urechitol A levels were variable. While three transgenic lines presented a lower content of urechitol A (0.7 to 1.9 $\mu\text{g gDW}^{-1}$) than that of the wild type control plant ($3.1 \pm 0.09 \mu\text{g gDW}^{-1}$), the 11 remaining transformed plant lines showed significantly higher amounts (4.04 to 10.54 $\mu\text{g gDW}^{-1}$), with a 3.35 and 3.39 fold increase observed in two of the transformed plant lines (Figure 3B).

The results of this investigation concure with previous studies reporting that the integration of *rol* genes into the plant genome has profound effects on development, growth, signaling, and the accumulation of secondary metabolites (Mauro *et al.* 2017). Transformation of *R. cardiflora* calluses with different arrays of *rolA*, *rolB* and *rolC* produced increased amounts of antraquinones, mainly due to the elevated expression of the isochorismate synthase (*ICS*), a key gene in the production of antraquinones (Shkryl *et al.* 2008). Similarly, insertion of *rolB* and *rolC* into *A. annua* plants results in a significant increase in production of the antimalarial sesquiterpenoid artemisinin and its precursors, artesunate and dihydroartemisinin (Dilshad *et al.* 2015). Furthermore, Dilshad *et al.* (2016) demonstrated that insertion of *rolB* and *rolC* genes in *A. annua*, resulted in higher yields of polyphenols, including quercetin, isoquercetin, rutin and caffeic acid.

Production of urechitol A in roots of wildtype *P. andrieuxii* begins after the first flowering and its content accumulates during plant development (Hiebert-Giesbrecht *et al.* 2016). The fact that production of urechitol A was detected in all the transformed plant lines before flowering, suggests that the insertion of *rol* genes modifies the regulation of urechitol A production and alters the ontogenic relationship between sesquiterpene accumulation and the developmental stage of the plant.

Even though the transformation of *P. andrieuxii* with *rol* genes had different effects on the accumulation of betulinic acid and urechitol A among the transformed lines (Figure 4A), eleven of fourteen transgenic lines showed higher levels of both betulinic acid and

urechitol A when compared to the wild type control plants. The precise mechanism of action of *rol* genes on biosynthesis of betulinic acid and urechitol A remains unclear. However, integration of *rol* genes into the plant genome can have profound effects on development, growth, signaling, biosynthesis and accumulation of a wide range of secondary metabolites, including terpenoids (Mauro *et al.* 2017; Bulgakov 2008).

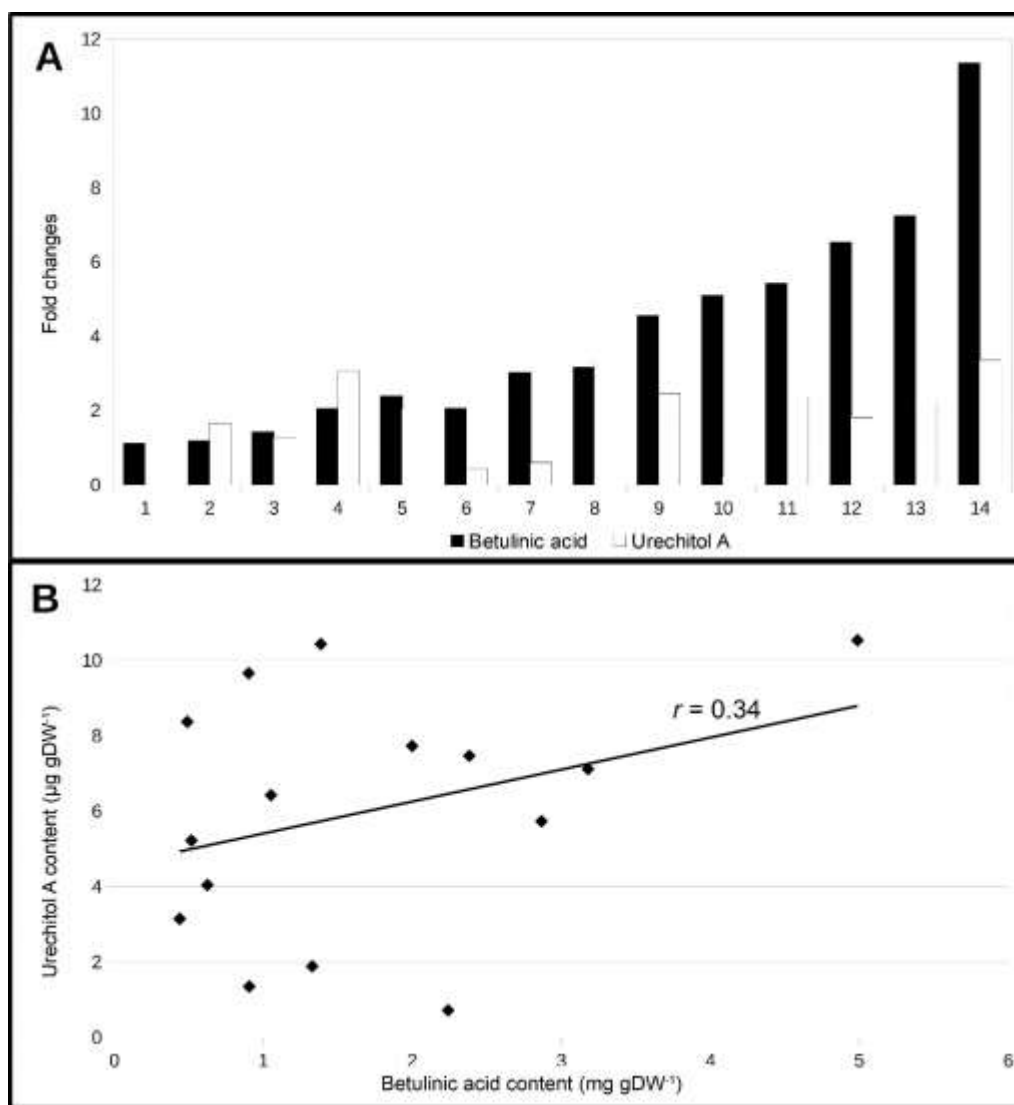


Figure 3.4. (A) Increase of betulinic acid and urechitol A represented as fold increases measured for betulinic acid and urechitol A in relation to the *Pentalinon andrieuxii* (Müll. Arg.) b.f. Hansen & Wunderlin wild type control. Fold increases were calculated using the equation “Content of analyte (transgenic lines)/ Content of analyte (Wild type control)”. (B) Scatter plot of the contents of betulinic acid vs urechitol A. The correlation coefficient (r) is 0.34.

The apparent independence of the changes introduced by the *rol* genes to the dynamics of the accumulation of betulinic acid and urechitol A (Figure 4B), as indicated by the low correlation coefficient ($r = 0.34$) between the two variables, strongly suggests that both biosynthetic pathways are unrelated. This is in agreement with several studies analyzing the effects of the introduction of the *rol* genes in plants genomes, which describe the apparent unpredictability in the influence of the transgenes on specific biosynthetic pathways (Bettini *et al.* 2016; Mauro *et al.* 2017; Sarkar *et al.* 2018). Future studies analyzing the expression patterns of the *rol* genes in transgenic plants will allow a better understanding of the underlying effects of these genes.

3.2.4. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 3.1. Contents of betulinic acid and urechitol A in the leaves and roots of transformed and wild type *P. andrieuxii* plant lines. Values are expressed as means, standard deviation (sd) and fold change in relation to the wild type control.

Plant lines	Content of betulinic acid (mg/g DW)	sd	Fold change of betulinic acid	Content of urechitol A (mg/g DW)	sd	Fold change of urechitol A
Control	0.4387	0.0167	N/A	0.0031	0.0001	N/A
1	0.4898	0.0318	1.12	0.0084	0.0013	2.71
2	0.5171	0.0099	1.18	0.0052	0.0005	1.68
3	0.6241	0.0084	1.42	0.0040	0.0005	1.29
4	0.9014	0.0262	2.05	0.0097	0.0010	3.13
5	0.9056	0.0327	2.06	0.0013	0.0001	0.42
6	1.0511	0.0248	2.15	0.0064	0.0014	2.06
7	1.3276	0.0381	3.03	0.0019	0.0000	0.61
8	1.3864	0.0815	3.16	0.0104	0.0010	3.35
9	1.9992	0.0862	4.56	0.0077	0.0015	2.48
10	2.2399	0.1261	5.11	0.0007	0.0005	0.23
11	2.3824	0.0513	5.43	0.0075	0.0006	2.42
12	2.8681	0.0327	6.54	0.0057	0.0006	1.84
13	3.1803	0.0185	7.25	0.0071	0.0007	2.29
14	4.9890	0.1354	11.37	0.0105	0.0010	3.39

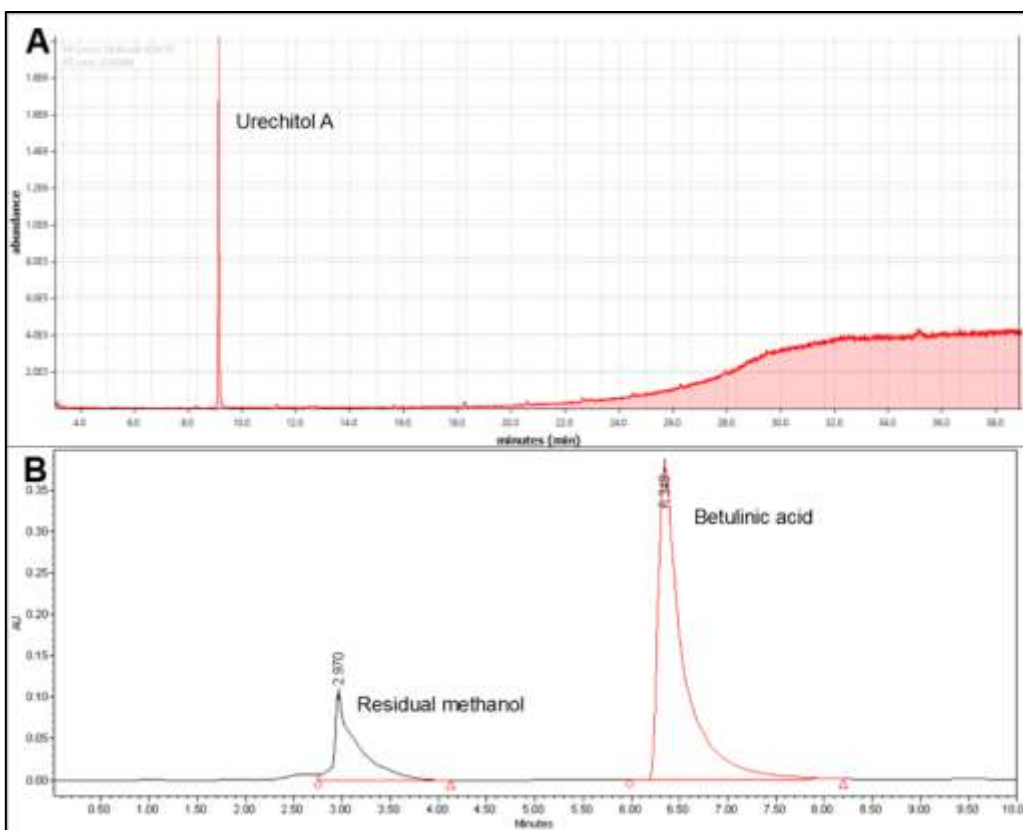


Figure 3.5. GC chromatogram of pure urechitol A (A). HPLC chromatogram of pure betulinic acid (B).

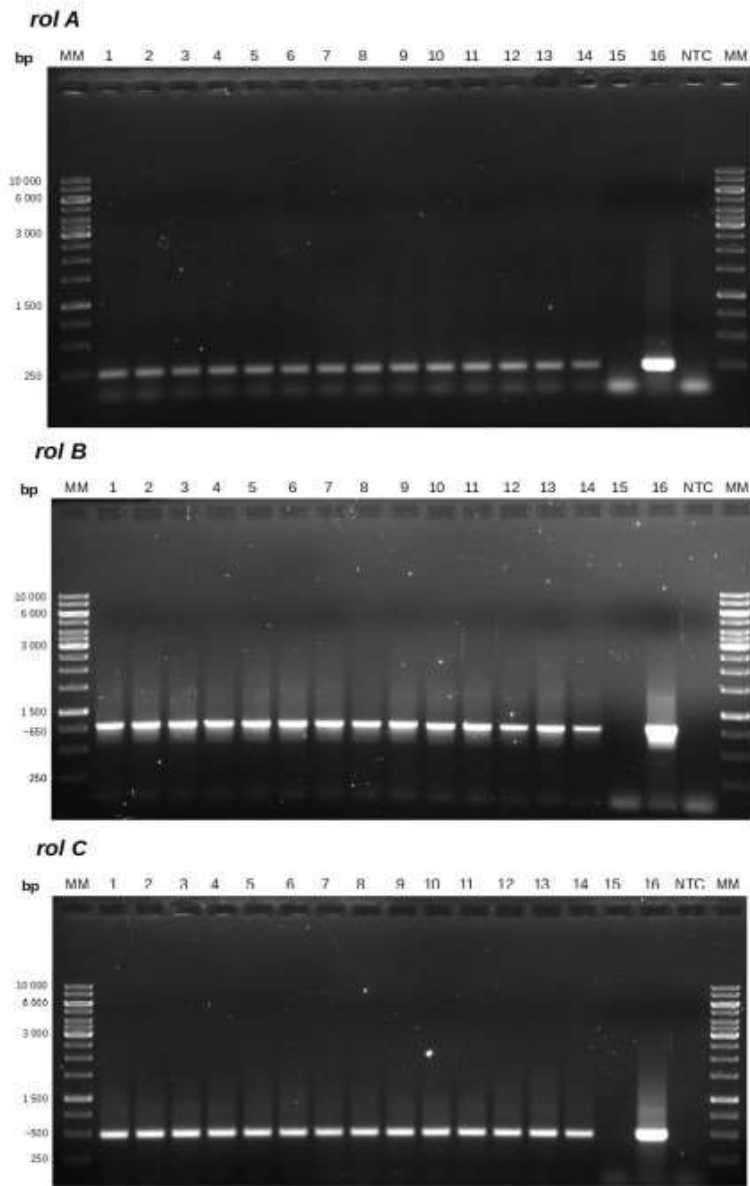


Figure 3.6. PCR amplification products for genes *rolA*, *rolB* and *rolC*. Lanes 1-14 represent the regenerated plant lines, lane 15 represents the untransformed *Wt* control plant, lane 16 represents the positive control (isolated *Agrobacterium rhizogenes* *Ri* plasmid) and NTC represents the blank sample with no DNA added to the reaction mixture.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

El urechitol A representa un reto científico de gran interés desde el punto de vista biosintético, porque a pesar de presentar similitudes estructurales con familias conocidas de metabolitos secundarios, también presenta importantes diferencias que dejan preguntas abiertas con respecto a su origen biosintético. La presencia de grupos metilos angulares en su estructura y la conformación del esqueleto carbonado en un sistema bicíclico, muy similar a la observada en familias de terpenoides, hace pensar que los urechitoles pertenecen a este grupo, ampliamente difundido y diverso en la naturaleza (Dewick, 2009). En los últimos años se ha llevado a cabo un número importante de esfuerzos con el fin de avanzar en el entendimiento de los procesos que permiten la producción de este metabolito en las raíces de *P. andrieuxii*. Con el fin de poder estudiar los procesos biosintéticos de esta especie, se han generado líneas celulares en suspensión (Yam-Puc et al., 2012a), se han cultivado raíces no transformadas en condiciones *in vitro*, han sido generadas líneas de raíces transformadas a través de *Agrobacterium rhizogenes* (May-Burgos et al., 2018) y se han regenerado plantas transgénicas a partir de esas líneas con la inserción de varios genes, como los genes *rol* (Hiebert-Giesbrecht et al., 2020). Sin embargo, el estudio del origen biosintético del urechitol A ha demostrado ser un desafío formidable debido, entre otras cosas, a que hasta el momento no ha sido posible lograr la producción de urechitol A en las líneas *in vitro*.

La falta de modelos *in vitro* capaces de producir urechitol A obligó a recurrir a estrategias que involucren el uso de plantas completas, fotosintéticamente activas. En ese sentido, el uso de $^{13}\text{CO}_2$ como precursor universal del metabolismo vegetal es de gran interés, ya que permite la introducción de una marca isotópica a los sistemas biosintéticos vegetales (Bacher et al., 2016). La principal limitante del uso de este tipo de estrategias para lograr el marcaje isotópico de metabolitos secundarios es la dificultad de predecir el inicio y la

tasa de producción de dichos metabolitos en la planta, especialmente en el caso de organismos no modelo y que no han sido completamente caracterizados, como *P. andrieuxii*. Debido a esto y previo a este estudio fue necesario evaluar la relación entre el desarrollo de la planta y los niveles de acumulación de urechitol A (Hiebert-Giesbrecht *et al.*, 2016). Esta información permitió desarrollar experimentos de pulso/acumulación en atmósferas modificadas con $^{13}\text{CO}_2$ que permitieron, por primera vez, obtener urechitol A marcado con ^{13}C . Además, ha sido posible determinar que es necesario someter a las plantas a pulsos largos, de más de 16 horas, para lograr el marcaje de urechitol A, estableciéndose así las condiciones experimentales más propicias para lograr el marcaje con ^{13}C del urechitol A.

Si bien la cantidad obtenida de urechitol A marcado isotópicamente no fue suficiente para permitir la realización completa de los análisis de distribución isotopomérica, sí fue posible el análisis de la distribución isotopológica por medio de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Por medio de este análisis se pudo observar la presencia de una cantidad significativa de isotopólogos M+3, característicos de la vía biosintética del metileritritol-3-fosfato (MEP), lo cual permite suponer que, al menos en parte, las unidades precursoras que conforman el urechitol A provienen de esta vía. Esta información da sustento a la hipótesis de un origen biosintético similar al de los derivados del guaiano y de que un isómero del germacreno sea un intermediario durante la biosíntesis del urechitol, ya que ha sido demostrado por experimentos de marcaje isotópico que el germacreno puede ser biosintetizado por la vía MEP (Steliopolus *et al.*, 2002).

Utilizando la misma metodología de marcaje bajo una atmósfera modificada con $^{13}\text{CO}_2$ también se aisló una muestra del triterpeno ácido betulínico, puro. A diferencia del urechitol A, el ácido betulínico tiene un origen biosintético bien definido y ha sido claramente establecido que proviene por la misma vía de otros lupanos, como el lupeol y la betulina (Dewick, 2009). Además, ha sido demostrado que estos triterpenos provienen íntegramente de la vía biosintética del ácido mevalónico (Peña-Rodríguez *et al.*, 2014). Los datos espectroscópicos obtenidos para la muestra de ácido betulínico antes mencionada presentan una total coincidencia con lo reportado en la literatura para el

lupeol, demostrando así su origen biosintético por la vía MVA y observándose una alta proporción del isotopólogo M+2 y una baja proporción del isotopólogo M+3. Esta distribución isotopológica difiere significativamente de la observada en el caso del urechitol A, reforzando así la idea de que la biosíntesis de éste se inicia por una vía diferente a la del ácido mevalónico.

La obtención de plantas élite, capaces de una mayor producción de urechitol A, era otra de las necesidades para el avance en la búsqueda del origen biosintético de los urechitoles. Por medio de la regeneración de plantas a partir de líneas de raíces transformadas (raíces peludas) por *A. rhizogenes*, ha sido posible obtener e identificar plantas regeneradas, con una mayor capacidad de producción de urechitol A y de ácido betulínico.

Futuros estudios podrán aprovechar estas plantas élite, así como las condiciones adecuadas para los experimentos de pulso/acumulación con $^{13}\text{CO}_2$ aquí presentadas y lograr el marcaje isotópico de cantidades suficientes de urechitol A. Esto permitirá realizar estudios espectroscópicos avanzados que a su vez permitirán realizar los análisis de distribución de isotopómeros y explicar el origen biosintético del urechitol A.

4.2. CONCLUSIONES GENERALES

Los experimentos de pulso/acumulación, utilizando $^{13}\text{CO}_2$ como precursor marcado permitieron establecer que, para lograr la incorporación de la marca isotópica a la estructura del urechitol A, es necesaria la aplicación de pulsos de, al menos, 16 horas de duración. Por otro lado, el tiempo de acumulación no parece afectar los niveles de incorporación de $^{13}\text{CO}_2$ al urechitol A dentro del rango de tiempo evaluado. Ha sido posible, por lo tanto, establecer condiciones adecuadas para el marcaje isotópico del urechitol A utilizando $^{13}\text{CO}_2$ como precursor.

La distribución isotopológica de los productos de marcaje del urechitol A indicó la presencia de una cantidad significativa de isotopólogos M+2 y M+3, lo cual coincide con lo esperado para terpenoides originados por la vía MEP.

Las líneas transgénicas, obtenidas por medio de la regeneración de plantas a partir de líneas de raíces transformadas de *P. andrieuxii*, poseen un gran potencial como plantas élite para la producción de terpenos, en particular, del ácido betulínico y del urechitol A, pues se observó que la inserción de los genes *rol* de *A. rhizogenes* al genoma de la planta permite un considerable incremento en la producción de estos metabolitos secundarios.

Los datos obtenidos permiten concluir que las unidades de difosfato de isopentenilo y difosfato de dimetilalilo que componen la estructura del urechitol A provienen muy probablemente de la vía MEP. Esto coincide con lo reportado para la biosíntesis de los guaianos y, más específicamente, de sus precursores, los isómeros del germacreno. Por lo cual la evidencia presentada aquí permite sostener la hipótesis de que los urechitales comparten parcialmente el origen biosintético con los guaianos.

4.3. PERSPECTIVAS

Obtener cantidades suficientes de urechitol A puro, marcado con ^{13}C por experimentos de pulso acumulación, para realizar los análisis completos de distribución de isotopólogos.

Caracterizar con más detalle las líneas de plantas de *P. andrieuxii* transgénicas obtenidas a través de la modificación con *A. rhizogenes* y desarrollar modelos *in vitro* a partir de las mismas, con el fin de realizar experimentos de marcaje con un mayor número de precursores en las vías de los terpenos.

Diseñar y realizar estudios de bioinformática utilizando el transcriptoma de *P. andrieuxii* en la búsqueda de genes que potencialmente estén relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios similares al urechitol A.

Evaluar la posible presencia de derivados glicosilados de los urechitales en los tejidos de *P. andrieuxii*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aburjai, T., Natsheh, F.M. (2003) Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research*, 17, 987–1000.
- Ali-Seyed, M., Jantan, I., Vijayaraghavan, K., Bukhari, SNA. (2016) Betulinic Acid: Recent Advances in Chemical Modifications, Effective Delivery, and Molecular Mechanisms of a Promising Anticancer Therapy. *Chemical Biology & Drug Design*, 87, 517–536.
- Ashour, M., Wink, M., Gershenzon, J. (2010) *Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition.*
- Bacher, A., Chen, F., Eisenreich, W., (2016) Decoding Biosynthetic Pathways in Plants by Pulse-Chase Strategies Using $^{13}\text{CO}_2$ as a Universal Tracer. *Metabolites*, 6, 21.
- Bentley, R. (1999) Secondary metabolite biosynthesis: the first century. *Critical Reviews in Biotechnology*, 19, 1–40.
- Bettini P., Marvasi M., Fani F., Lazzara, L., Cosi, E., Melani, L., Mauro, ML. (2016) *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene affects photosynthesis and chlorophyll content in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Plant Physiology*, 204, 27–35.
- Bian Z., Yang Q., Liu W. (2015) Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: A review. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 95, 869–877.
- Blay, G., García, B., Molina, E., Pedro, J.R. (2006) A bioinspired approach to tri-nor-guaianes. Synthesis of (-)-clavukerin A. *Journal of Natural Products*, 69, 1234–1236.
- Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Lacoux J, Fliniaux, M., Jacquin-Dubreuil, A. (2000) Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium*

- tumefaciens* containing rol A, B, C genes only. Journal of Biotechnology, 81, 151–158.
- Bothwell, J., Griffin, J. (2011) An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biological Reviews, 86, 493–510.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161, 839–851.
- Boughton, B.A., Thinakaran, D., Sarabia, D., Bacic, A., Roessner, U. (2016) Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. Phytochemistry Reviews, 15, 445–488.
- Brauman, J.I., (1966) Least Squares Analysis and Simplification of Multi-Isotope Mass Spectra. Analytical Chemistry, 38, 607–610.
- Brown, P., Tokuhisa, J., Reichelt, M., Gershenzon, J. (2003) Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry, 62, 471–481.
- Bulgakov, V. (2008) Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. Biotechnology Advances, 26, 318–324.
- Bulgakov, V., Khodakovskaya, M., Labetskaya, N., Chernoded, G., Zhuravlev, Y. (1998) The impact of plant *ro/C* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. Phytochemistry, 49, 1929–1934.
- Bülow, N., König, W. (2000) The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: Investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. Phytochemistry, 55, 141–168.
- Burgos-May, Y., Avilés-Berzunza, E., Peña-Rodríguez, L.M., Godoy-Hernández, G. (2018) Genetic Transformation of *Pentalinon andrieuxii* Tissue Cultures. In: Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology. pp. 475–492

- Butler, M.S., (2004) The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141–2153.
- Calvin, M., Benson, A. (1949) The path of carbon in photosynthesis. *Science*, 109, 140–142
- Carvalho SD, Schwieterman ML, Abrahan CE, Colquhoun, T., Folta, K. (2016) Light quality dependent changes in morphology, antioxidant capacity, and volatile production in sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–14.
- Chatterjee, P., Kouzi, S.A., Pezzuto, J.M., Hamann, M.T. (2000) Biotransformation of the Antimelanoma Agent Betulinic Acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3850–3855.
- Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, Chantal D., Casse-Delbart, F., Tempé, J. (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 295, 432–434
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., (2000) Natural Products (Secondary Metabolites), in: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. pp. 1250–1318.
- Dai, M.C., Garson, M.J., Coll, J.C., (1991) Biosynthetic processes in soft corals. I. A comparison of terpene biosynthesis in *Alcyonium molle* (Alcyoniidae) and *Heteroxenia* sp. (Xeniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 99, 775–783.
- De Kraker, J.W., Franssen, M.C.R., De Groot, A., König, W.A., Bouwmeester, H.J. (1998) (+)-Germacrene A biosynthesis-The committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant Physiology*, 117, 1381–1392.
- De Oliveira B., Santos C., Espíndola A. (2002) Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, 13, 95–98.

- Degenhardt, J., Köllner, T.G., Gershenzon, J. (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70, 1621–1637.
- Dewick, P.M. (2009) *Medicinal Natural Products - A biosynthetic approach*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex. pp. 546.
- Dickschat, J.S., Bode, H.B., Mahmud, T., Müller, R., Schulz, S. (2005) A novel type of geosmin biosynthesis in myxobacteria. *Journal of Organic Chemistry*, 70, 5174–5182.
- Dickschat, J.S., Wenzel, S.C., Bode, H.B., Müller, R., Schulz, S. (2004). Biosynthesis of volatiles by the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *ChemBioChem*, 5, 778-787.
- Dilshad, E., Cusido, R., Palazon, J., Estrada, K., Bonfill, M., Mirza, B. (2015) Enhanced artemisinin yield by expression of rol genes in *Artemisia annua*. *Malaria Journal*, 14, 1–10.
- Domínguez-Carmona, D.B., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Ruiz-Pinell, G., Gutierrez-Yapu, D., Chan-Bacab, M.J., Giménez-Turba, A., Peña-Rodríguez, L.M. (2010) Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. *Phytomedicine*, 17, 379–382.
- Drew, D.P., Krichau, N., Reichwald, K., Simonsen, H.T. (2009) Guaianolides in apiaceae: Perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 8, 581–599.
- Duker-Eshun, G., Jaroszewski, J., Asomaning, W., Opong-Boachie, F., Christensen, S. (2004) Antiplasmodial Constituents of *Cajanus cajan*. *Phytotherapy Research*, 18, 128–130.
- Eisenreich, W., Rohdich, F., Bacher, A. (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6, 78–84.

- Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., Scheffer, J., (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants : volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 213–226.
- Fraga, B. (2007) Natural sesquiterpenoids. *Natural Products Reports*, 24, 1350–1381.
- GBIF Secretariat (2019). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset *Pentalinon andrieuxii* (Müll.Arg.) B.F.Hansen & Wunderlin [Online]. Disponible en: <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org [Acceso 11 febrero 2020].
- Gräwert, T., Groll, M., Rohdich, F., Bacher, A., Eisenreich, W. (2011) Biochemistry of the non-mevalonate isoprenoid pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 3797–3814.
- Georgiev, M.I., Agostini, E., Ludwig-Müller, J., Xu, J. (2012) Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnology*, 30, 528–537.
- Hartmann, T. (2007) From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831–2846.
- Haslam, E. (1986) Secondary Metabolism - Fact and Fiction. *Natural Products Reports*, 3, 217–249.
- Hiebert-Giesbrecht, M.R., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Dzib, G.R., Calvo-Irabien, L.M., Peña-Rodríguez, L.M. (2016) Spatio-Temporal Variation of Terpenoids in Wild Plants of *Pentalinon andrieuxii*. *Chemistry & Biodiversity*. 13, 1521–1526.
- Hiebert-Giesbrecht, M., Novelo-Rodríguez, C., Dzib, G., Calvo-Irabien, L.M., von Arx, G., Peña-Rodríguez, L.M. (2018) Herb-chronology as a tool for determining the age of perennial forbs in tropical climates. *Botany*. 96, 73–78.
- Honda, T., Ishige, H., Nagase, H. (1994) Chiral synthesis of a trinorguaiene sesquiterpene, clavukerin A. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 3305–3310.

- Huang, L., Li, J., Ye, H., Li, C., Wang, H., Liu, B., Zhang, Y. (2012) Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*. *Planta*, 236, 1571–1581.
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M.N., Scheffler, A. (2009) Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. *Molecules*, 14, 2016–2031.
- Jiang, J., Cane, D. (2008) Geosmin biosynthesis. Mechanism of the fragmentation-rearrangement in the conversion of germacradienol to geosmin. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 428–429.
- Jiang, J., He, X., Cane, D. (2006) Geosmin biosynthesis. *Streptomyces coelicolor* germacradienol/germacrene D synthase converts farnesyl diphosphate to geosmin. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 8128–8129.
- Jin, C.C., Zhang, J.L., Song, H., Cao, Y.X. (2019) Boosting the biosynthesis of betulinic acid and related triterpenoids in *Yarrowia lipolytica* via multimodular metabolic engineering. *Microbial Cell Factories*, 18, 1–18.
- Kamen, M.D. (1947) Use of isotopes in biochemical research: Fundamental aspects. *Annual Review of Biochemistry*, 16, 631–655.
- Knüppel, S., Rogachev, V.O., Metz, P. (2010) A concise catalytic route to the marine sesquiterpenoids (-)-clavukerin A and (-)-isoclavukerin A. *European Journal of Organic Chemistry*, 6145–6148.
- Kobayashi, M., Son, B.W., Kido, M., Kyogoku, Y., Kitagawa, I. (1983) Clavukerin A, a new trinor-guaiane sesquiterpene from the okinawan soft coral *Clavularia koellikeri*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 2160–2163.
- Kutzner, E., Manukyan, A., Eisenreich, W. (2014) Profiling Of Terpene Metabolism in ¹³CO₂-Labelled *Thymus transcaucasicus*. *Metabolomics*, 4.

- Krishnamurti, C., Rao, S.S.C.C. (2016) The isolation of morphine by Serturmer. *Indian Journal of Anaesthesia*. 60, 861–862.
- Lee, W.N.P., Byerley, L.O., Bergner, E.A. and Edmond, J. (1991) Mass isotopomer analysis: Theoretical and practical considerations. *Biological Mass Spectrometry*. 20, 451–458.
- Li, J., Goto, M., Yang, X., Morris-Natschke, S., Huang, L., Chen, C., Lee, K. (2016) Fluorinated betulinic acid derivatives and evaluation of their anti-HIV activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 68–71.
- Liu, Z., Carpenter, S.B., Bourgeois, W.J., Yu, Y., Constantin, R.J., Falcon, M.J., Adams, J.C. (1998) Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in *Camptotheca acuminata*. *Tree Physiology*, 18, 265–270.
- Matveeva, T.V., Sokornova, S.V. (2018) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of plants for improvement of yields of secondary metabolites, en: *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*. Reference Series in Phytochemistry, Pavlov A., Bley, T. (eds). Springer, Cham. pp. 161–201.
- Mauro, M.L., Costantino, P., Bettini, P.P. (2017) The never ending story of *rol* genes: A century after. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131, 201–212.
- May, B., Lange, B.M., Wüst, M. (2013) Biosynthesis of sesquiterpenes in grape berry exocarp of *Vitis vinifera* L.: Evidence for a transport of farnesyl diphosphate precursors from plastids to the cytosol. *Phytochemistry*. 95, 135–144.
- McGarvey, D.J., Croteau, R. (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1015–1026.
- Mert-Turk, F., Bennett, M., Mansfield, J., Holub, E. (2003) Quantification of Camalexin in Several Accessions of *Arabidopsis thaliana* following Inductions with *Peronospora parasitica* and UV-B Irradiation. *Phytoparasitica*, 31, 81–89.

- Mithöfer, A., Boland, W. (2012) Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 431–450.
- Morales, J.F. (2009) Estudios en las Apocynaceae neotropicales XXXIX: revisión de las Apocynoideae y Rauvolfioideae de Honduras. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 66, 217–262.
- Pan, L., Lezama-Davila, C., Isaac-Marquez, A., Calomeni, E., Fuchs, J., Satoskar, A., Kinghorn, A. (2012) Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry*, 82, 128–135.
- Pavlova, O., Matveyeva, T., Lutova, L. (2016) *Rol*-genes of *Agrobacterium rhizogenes*. *Ecological Genetics*, 11, 137–145.
- Peña-Rodríguez, L.M., Yam-Puc, A., Knispel, N., Schramek, N., Huber, C., Graßberger, C., Ramírez-Torres, F.G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Hiebert-Giesbrecht, M.R., Chan-Bacab, M.J., Godoy-Hernández, G., Bacher, A., Eisenreich, W. (2014) Isotopologue profiling of triterpene formation under physiological conditions. Biosynthesis of lupeol-3-(3'-R-hydroxy)-stearate in *Pentalinon andrieuxii*. *Journal of Organic Chemistry*, 79, 2864–2873.
- Phillips, G.C., Collins, G.B. (1979) In Vitro Tissue Culture of Selected Legumes and Plant Regeneration from Callus Cultures of Red Clover. *Crop Science*, 19, 59–64.
- Phillips, D., Rasbery, J., Bartel, B., Matsuda, S. (2006) Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr. Opin. Plant Biology*, 9, 305–314.
- Phillipson, J.D. (2001) Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, 56, 237–243.
- Pulido, M.T., Serralta, L. (1993) Lista anotada de las plantas medicinales de uso actual en el Estado de Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo.
- Qiao, X., Sai, L., Chen, X., Xue, L., Lei, J. (2019) Impact of fruit-tree shade intensity on the growth, yield, and quality of intercropped wheat. *PLoS One*, 14, 1–17.

- Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, G.W., Sagen, H.E. (1930) Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *Journal of Agricultural Research*, 41, 507-540
- Rohmer, M. (1999) A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 2, 45–68.
- Römisch-Margl, W., Schramek, N., Radykewicz, T., Ettenhuber, C., Eylert, E., Huber, C., Römisch-Margl, L., Schwarz, C., Dobner, M., Demmel, N., Winzenhörlein, B., Bacher, A., Eisenreich, W. (2007). $^{13}\text{CO}_2$ as a universal metabolic tracer in isotopologue perturbation experiments. *Phytochemistry*, 68, 2273–2289.
- Sarkar, S., Ghosh, I., Roychowdhury, D., Jha, S. (2018) The Effects of *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* on Morphogenesis and Secondary Metabolite Accumulation in Medicinal Plants. En: *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization*, Kumar N (ed). Springer Singapore, Singapore, pp 27–51
- Schmitz, R. (1985). Friedrich Sertürner and the Discovery of Morphine. *Pharmacy in History*, 27, 61–74.
- Schoenheimer, R., Rittenberg, D. (1935) Deuterium as an Indicator in the Study of Intermediary Metabolism. *Science*, 82, 156–157.
- Schramek, N., Wang, H., Römisch-Margl, W., Keil, B., Radykewicz, T., Winzenhörlein, B., Beerhues, L., Bacher, A., Rohdich, F., Gershenzon, J., Liu, B., Eisenreich, W. (2010). Artemisinin biosynthesis in growing plants of *Artemisia annua*. A $^{13}\text{CO}_2$ study. *Phytochemistry*, 71, 179–187.
- Serturner, F. (1817). Ueber das Morphinum, eine neue falzfähige Grundlage, und die Mekonsäure, als Hauptbestandtheile des Opiums. *Annale der Physic*. 55, 56–89.
- Shkryl, Y., Veremeichik, G., Bulgakov, V., Tchernoded, G., Mischenko, N., Fedoreyev, S., Zhuravlev, Y. (2008) Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on

- anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnology and Bioengineering*, 100, 118–125.
- Simonsen, H.T., Weitzel, C., Christensen, S.B. (2013) Guaianolide Sesquiterpenoids: Pharmacology and Biosynthesis, en: *Natural Products*, Ramawat, K.G., Merillon, J.M. (Eds.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 3069–3098.
- Simpson, T.J. (1998) Application of isotopic methods to secondary metabolic pathways. *Biosynthesis*, 195, 1–48.
- Steliopoulos, P., Wüst, M., Adam, K.P., Mosandl, A. (2002) Biosynthesis of the sesquiterpene germacrene D in *Solidago canadensis*: ^{13}C and ^2H labeling studies. *Phytochemistry*, 60, 13–20.
- Sumiya, T., Ishigami, K., Watanabe, H. (2010) Stereoselective total synthesis of (+/-)-urechitol A. *Angewandte Chemie*, 49, 5527–5528.
- Takeda, R., Katoh, K. (1983) 3,10-Dihydro-1,4-dimethylazulene, a Labile Biosynthetic Intermediate Isolated from Cultured Cells of Liverwort *Calypogeia granulata* Inoue. *Journal of the American Chemical Society*. 105, 4056–4058.
- Tapia-Tussell, R., Quijano-Ramayo, A., Rojas-Herrera, R., Larque-Saavedra, A., Perez-Brito, D. (2005) A fast, simple, and reliable high-yielding method for DNA extraction from different plant species. *Molecular Biotechnology*, 31, 137–139.
- Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R., Rahman, S.K. (1989) Why are secondary metabolites (Natural Products) Biosynthesized? *Journal of Natural Products*, 52, 1189–1208.
- Wu, J., Niu, Y., Bakur, A., Li, H., Chen, Q. (2017) Cell-free production of pentacyclic triterpenoid compound betulinic acid from betulin by the engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules*, 22.

- Yam-Puc, A., Avilés-Berzunza, E., Chan-Bacab, M.J., Peña-Rodríguez, L.M., Godoy-Hernández, G. (2012) *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Pentalinon andrieuxii* Müll. Arg. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 256–258.
- Yam-Puc, A., Chee-González, L., Escalante-Erosa, F., Arunachalampillai, A., Wendt, O.F., Sterner, O., Godoy-Hernández, G., Peña-Rodríguez, L.M. (2012) Steroids from the root extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Phytochemistry Letters*, 5, 45–48.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Ramírez-Torres, F.G., Chan-Bacab, M.J., Eisenreich, W., Huber, C., Knispel, N., Godoy-Hernández, G., Peña-Rodríguez, L.M., (2013) A case of mistaken identity : Lupeol-3-(3-O-R)-hydroxy-stearate can be mistakenly identified as lupeol acetate when only analyzed by GC–MS. *Phytochemistry Letters*, 6, 649–652.
- Yam-Puc, A., Escalante-Erosa, F., Pech-Lopez, M., Chan-Bacab, M.J., Arunachalampillai, A., Wendt, O.F., Sterner, O., Peña-Rodríguez, L.M. (2009) Trinorsesquiterpenoids from the Root Extract of *Pentalinon andrieuxii*. *Journal of Natural Products*. 72, 745–748.
- Ziegler, H.L., Franzyk, H., Sairafianpour, M., Tabatabai, M., Tehrani, M.D., Bagherzadeh, K., Hägerstrand, H., Stærk, D., Jaroszewski, J.W. (2004) Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12, 119–127.