



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Localización celular de la síntesis de alcaloides en
Argemone mexicana L.

Tesis que presenta

José Ignacio Laines Hidalgo

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

Ciencias Biológicas: Bioquímica y Biología Molecular

Mérida, Yucatán, México

26 de febrero de 2024

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



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de José Ignacio Laines Hidalgo titulado “Análisis de los sitios de biosíntesis en tejidos de *Argemone mexicana* L.” fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, de la línea de investigación en metabolismo integrativo, del laboratorio 25 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 26 de febrero de 2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



Firma: _____

Nombre: José Ignacio Laines Hidalgo

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biología Integrativa del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “**Localización de los sitios de síntesis y acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* L (chicalote)**”, financiado por CONAHCYT (CB-2016-01-0285887), bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al CONAHCYT por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado (Núm:815650).
- Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por su programa de posgrado de calidad para realizar mis estudios de doctorado en Ciencias Biológicas.
- A la Unidad de Biología Integrativa (antes de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas) por las facilidades brindadas para mis estudios.
- A la Dra. Ángela Francisca Kú González, por su asesoría en las técnicas de histología y microscopía.
- Al Dr. Víctor Manuel Carballo Uicab, por sus comentarios sobre la realización de los métodos para la localización *in situ* por PCR
- A la MC. Miriam del Socorro Monforte González y al Dr. Armando Muñoz por su apoyo técnico en el laboratorio.
- Al Dr. Gastón Contreras Jiménez, del Laboratorio de Microscopía Avanzada y Microdissección Láser, del Instituto de Ecología, UNAM, por su apoyo técnico en microscopía y en el análisis de imágenes durante la estancia de investigación.
- A mi asesor y amigo, el Dr. Felipe Vázquez Flota, por su dirección durante mis estudios de doctorado y mi formación como investigador.
- Al comité tutorial conformado por el Dr. Gregorio Godoy Hernández y al Dr. Jorge Rubio Piña, por sus consejos que ayudaron a la realización del proyecto de doctorado.
- A los Drs. Renata Rivero Madrid, Edmundo Lozoya Gloria (CINVESTAV

Irapuato), Ignacio Islas Flores y Víctor Aguilar Hernández por ser parte del comité revisor de tesis.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Artículos

- Laines-Hidalgo, J. I., Muñoz-Sánchez, J. A., Loza-Müller, L., & Vázquez-Flota, F. (2022). An update of the sanguinarine and benzophenanthridine alkaloids' biosynthesis and their applications. *Molecules*, 27(4), 1378.
- Loza-Muller, L. J., Laines-Hidalgo, J. I., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2021). Alkaloid distribution in seeds of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Journal of the Mexican Chemical Society*, 65(4), 501-506.

Capítulos de libro

- Laines-Hidalgo JI, Kú-González AF, Vázquez-Flota F, A novel method for *In situ* RT-PCR based on capsules from centrifuge tubes, ideal to transcripts detection in plant tissues, In: Loyola-Vargas VM, Ochoa Alejo N (eds), *Plant Cell Culture Protocols* 5th ed. Humana Press/Springer Nature, New York NY; en prensa.

Presentaciones en congreso

- Laines-Hidalgo JI, Kú-González A, Vázquez-Flota F; Cellular distribution of alkaloids in *Argemone mexicana* L.XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica, Mérida 16-21 octubre 2022 (cartel).

DEDICATORIAS

- A Dios, mi amigo y mi sustentador. Por la sabiduría, la salud y la vida prestada para realizar mis estudios de doctorado.
- A mis padres, Neftalí Laines y Dolores Hidalgo. Quienes me aman y dan todo hacía a mí. Su apoyo incondicional y sus abrazos en todo momento. Con mucho amor les dedico este trabajo.
- A mis amigos Sergio García, Gilberto Muñoz, Federico García, Natali Campos, Aralé Contreras. Quienes más que amigos son hermanos y quienes también me extendieron la mano en momentos difíciles.
- A todos los compañeros y amigos del laboratorio 25 de la UBI y del CICY, que hicieron agradable la estancia durante mis estudios.
- A cada una de las personas que contribuyeron para que yo pudiera lograr mis estudios de doctorado. A Juan Pinto, Omar Díaz, Rene Contreras, Luis Vargas, Juan Carlos Ruiz, y muchas más personas que me estiman.

ÍNDICE

| | Pag |
|---|-----|
| Introducción | 1 |
| Capítulo I. Antecedentes | 3 |
| 1.1 <i>Argemone mexicana</i> | 3 |
| 1.2 Importancia de los alcaloides sanguinarina y berberina | 5 |
| 1.3 Distribución taxonómica de los alcaloides berberina y sanguinarina | 7 |
| 1.4 Biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinólicos ABIs | 9 |
| 1.5 Distribución tisular de los ABIs en <i>A. mexicana</i> | 15 |
| 1.5.1 La capacidad biosintética en etapas tempranas de <i>A. mexicana</i> | 15 |
| 1.5.2 Los sitios de biosíntesis y la distribución tisular de los alcaloides en plantas adultas de <i>A. mexicana</i> | 15 |
| 1.5.3 La biosíntesis de alcaloides en cultivos <i>In vitro</i> de <i>A. mexicana</i> | 17 |
| 1.6 Biosíntesis, tráfico y acumulación de los ABIs | 17 |
| 1.6.1 Metabolismo intracelular de los ABIs | 16 |
| 1.6.2 La biosíntesis de alcaloides en las plantas involucra la participación de células específicas | 19 |
| 1.7 Panorama general de los estudios realizados en la localización <i>In situ</i> de las células específicas biosintéticas de ABIs | 22 |
| 1.8 Recapitulación de los antecedentes | 24 |
| 1.9 Justificación | 26 |
| 1.10 Objetivos | 27 |

| | |
|--|----|
| 1.11 Diagrama experimental | 28 |
| CAPÍTULO II: Materiales y métodos | 29 |
| 2.1 Material vegetal y almacenamiento | 29 |
| 2.2 Métodos | 30 |
| 2.2.1 Preparación de las secciones de tejidos | 30 |
| 2.2.2 Identificación de los tejidos en las secciones histológicas | 30 |
| 2.2.3 Detección de alcaloides en los diferentes tipos celulares | 31 |
| 2.4 Identificación de los sitios de biosíntesis de alcaloides por hibridación <i>In situ</i> RT-PCR | 32 |
| Capítulo III: Resultados | 38 |
| 3.1. Identificación de los tipos celulares en secciones histológicas | 38 |
| 3.1.1 Análisis histoquímico de secciones de tallos | 38 |
| 3.1.2 Análisis histoquímico de secciones de raíces | 41 |
| 3.1.3 Análisis histoquímico de secciones de hojas | 43 |
| 3.2 Detección <i>In situ</i> de alcaloides en tejidos de <i>A. mexicana</i> | 44 |
| 3.2.1 Detección <i>In situ</i> de alcaloides por fluorescencia | 45 |
| 3.2.2 Tinción <i>In situ</i> de los alcaloides de <i>A. mexicana</i> con el reactivo de Draggendorf | 52 |
| 3.3 Detección <i>In situ</i> de los transcritos involucrados en la biosíntesis de alcaloides en tejidos de <i>A. mexicana</i> | 54 |
| Capítulo IV: Conclusiones | 57 |
| Capítulo V: Perspectivas | 61 |

| | |
|---------------------------|----|
| Bibliografia | 62 |
| Anexos | 70 |

LISTADO DE FIGURAS

| | Pág |
|---|-----|
| Figura 1 Planta de <i>A. mexicana</i> | 3 |
| Figura 2. Distribución tisular de los alcaloides producidos por <i>A. mexicana</i> ... | 4 |
| Figura 3. Distribución taxonómica de los alcaloides sanguinarina y berberina. | 8 |
| Figura 4. Los ABIs se forman a partir de tirosina | 9 |
| Figura 5. Segunda etapa de la biosíntesis de ABIs | 10 |
| Figura 6. Ruta específica para la biosíntesis de berberina | 11 |
| Figura 7. Ruta específica para la biosíntesis de sanguinarina | 12 |
| Figura 8. Ruta condensada de la biosíntesis de los alcaloides berberina y sanguinarina | 14 |
| Figura 9: Localización intracelular de sanguinarina en cultivos de <i>A.</i> <i>mexicana</i> | 17 |
| Figura 10. Células especializadas en la producción de alcaloides | 21 |
| Figura 11. Sitios de acumulación y de biosíntesis de alcaloides en <i>T. flavum</i> | 22 |
| Figura 12. Panorama general de los estudios realizados en la localización <i>In</i> <i>situ</i> de las células específicas biosintéticas de ABIs | 23 |
| Figura 13. Estrategia experimental | 28 |
| Figura 14. Colecta de material vegetal | 29 |
| Figura 15: Cápsula de hibridación <i>In situ</i> | 33 |
| Figura 16. Tinción histoquímica con azul de toluidina de una sección transversal del tallo de <i>A. mexicana</i> | 41 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Tinción histoquímica con azul de toluidina de una sección transversal de la raíz de <i>A. mexicana</i> | 41 |
| Figura 18. Tinción histoquímica con azul de toluidina de una sección transversal de hoja de <i>A. mexicana</i> | 43 |
| Figura 19. Detección de autofluorescencia en tejidos de <i>A. mexicana</i> por microscopía confocal | 6 |
| Figura 20. Análisis de las fluorescencias en criosecciones de tallo, raíz y hoja, lavadas con metanol | 49 |
| Figura 21. Impresiones de tejido en tallo (fila A) y semilla madura (fila B) | 50 |
| Figura 22. Detección de alcaloides en tejidos de <i>A. mexicana</i> (panel superior) y <i>R. tuberosa</i> (panel inferior), por tinción con el reactivo de Draggendorff | 52 |
| Figura 23. Análisis de expresión de los genes ABIs en criosecciones de tallo | 54 |
| Figura 24. Análisis de expresión de los genes ABIs en criosecciones de raíz | 55 |
| Figura 25. Sitios de acumulación de alcaloides y de expresión de los genes ABIs en tejidos de <i>A. mexicana</i> | 60 |

ABREVIATURAS

- ABIs: alcaloides bencilisoquinólicos
 - BBE: reticulina oxidasa (berberine bridge enzyme)
 - CheSyn: queilantifolina sintasa
 - CYP719: canadina sintasa
 - DBOX: dihidrobenzofenantridina oxidasa
 - MSH: metiltetrahidroprotoberberina 14-monooxigenasa
 - NCS: norcoclaurina sintasa
 - P6H: protopina 6-hydroxilasa
 - SanR: sanguinarina reductasa
 - SOMT: escoulerina-9-O-metiltransferasa
 - STOX: tetrahidroprotoberberina oxidasa
 - StySyn: estilopina sintasa
 - TNMT: tetrahidroprotoberberina N-metiltransferasa
 - TyDC: tirosina descarboxilasa
 - 6OMT: norcoclaurina-6-O-metiltransferasa
-

RESUMEN

Argemone mexicana Linn (Papaveraceae) es una planta productora de alcaloides del tipo bencilisoquinólicos (ABI); siendo la sanguinarina (benzofenantridina) y la berberina (protoberberina) los acumulados en mayores cantidades. En otras especies, la biosíntesis de los ABIs involucra la participación de tipos celulares definidos en los que se reparte la transcripción de los genes biosintéticos; la traducción de las proteínas enzimáticas que forman la ruta biosintética y el almacenamiento de los productos finales, y cuya distribución a larga distancia podría depender de transportadores. En *A. mexicana* se desconocen los elementos participantes en la biosíntesis y en la acumulación de sus alcaloides. En este trabajo presentamos la detección *In situ* de los sitios de acumulación de alcaloides, aprovechando sus propiedades fluoroscópicas, y de los transcritos involucrados en la ruta biosintética, por *In Situ* RT-PCR en secciones histológicas. Para el análisis, la ruta biosintética se dividió en tres tramos, el primero correspondiente a las reacciones comunes para la síntesis de berberina y sanguinarina y representado por los transcritos para las enzimas norcoclaurina sintasa (*NCS*) y del puente de la berberina (*BBE*). Los tramos restantes correspondieron a las reacciones que conducen de manera específica a la síntesis de berberina y sanguinarina, representados escoulerina O-metiltransferasa (*SOMT*) y estilopina sintasa (*StySyn*), respectivamente. En secciones de raíces, los sitios de acumulación de alcaloides se encontraron en la rizodermis y en células asociadas al tejido conductor en la zona del cilindro, aunque los transcritos se encontraron principalmente en la corteza y periciclo. Por su parte, en el tallo las señales de fluorescencia, atribuida a la presencia de alcaloides, se encontraron en el tejido conductor. Las señales de la presencia de los transcritos para todos los genes analizados se detectaron en células del tejido conductor, y en la epidermis; únicamente *BBE* se detectó en la epidermis. Estos datos sugieren que la síntesis de alcaloides en esta planta podría requerir el transporte de intermediarios entre las células de un mismo tejido y asociarse con el transporte a larga distancia.

ABSTRACT

Argemone mexicana Linn (Papaveraceae) is a plant that produces benzyloisoquinoline alkaloids (BIA). The major alkaloids accumulated by this plant are berberine (protoberberine) and sanguinarine (benzophenanthridine). In other species, BIA biosynthesis involves three different cell types, and thus, distributing gene transcription and translation, as well as product accumulation, which may require transporter-dependent long-distance distribution. In *A. mexicana*, the cellular elements involved in the biosynthesis and accumulation of alkaloids are currently unknown. This work presents an analysis of alkaloid synthesis and accumulation sites, taking advantage of their fluoroscopic properties and by *In situ* RT-PCR on histological sections. For this analysis, the biosynthetic pathway was divided into three segments: one corresponding to the initial and common reactions, represented by norcoclaurine synthase (NCS) and the berberine bridge enzyme (BBE) and the other two by those leading specifically to berberine and sanguinarine, represented by scoulerine O-methyltransferase (SOMT) and stylophine syntase (*StySyn*), respectively. In root sections, fluorescence signals indicated alkaloid presence in the rhizodermis and the vascular cylinder, whereas transcripts for all the analyzed enzymes were detected in cortex and pericycle, but not in the rhizodermis. In stem sections, fluorescence attributed to alkaloids was observed in the vascular cells, whereas transcripts for all the analyzed enzymes were detected in vascular cells and epidermis, only BBE was detected in the epidermis. Data suggest that alkaloid synthesis in this plant may require translocation of intermediaries between cells within the same tissue and its possible association to long distance mobilization.

INTRODUCCIÓN

Argemone mexicana L es una planta de la familia Papaveracea que se distingue como productora de alcaloides tipo bencilisoquinólicos (ABIs), formados a partir de la tirosina (Brahmachari et al. 2013). Los alcaloides mayoritarios en esta planta son la berberina (tipo protoberberina), que se distribuye por todos los tejidos de la planta, y la sanguinarina (benzofenantridina) encontrada en la raíz y en semillas de etapas maduras (Vázquez-Flota et al., 2018). A esta planta se le han atribuido propiedades medicinales y muy probablemente esto se deba a la presencia de los alcaloides que acumula. Por ello, las culturas antiguas empleaban ciertos tejidos para el tratamiento de nubes o cataratas y para algunas enfermedades cutáneas (Rubio-Piña y Vázquez-Flota 2013). La importancia de los alcaloides berberina y sanguinarina surge a raíz de las distintas aplicaciones en el área de salud e industrial (Laines-Hidalgo et al., 2022). Por ejemplo, la berberina muestra propiedades antimicrobianas y funge como protector intestinal (Bae et al., 1998). También a este alcaloide se le atribuyen propiedades anticancerígenas, ya que puede promover la apoptosis en células leucémicas humanas (Kuo et al., 1995). Por su parte, la sanguinarina se emplea como aditivo en alimento para ganado, favoreciendo la digestión del pienso de estos animales (Rubio-Piña y Vázquez-Flota 2013).

A pesar de su similitud estructural y de compartir las primeras etapas de síntesis, estos alcaloides coinciden en pocos casos en una misma especie lo que hace de *A. mexicana* un modelo único para el estudio de los mecanismos que controlan la distribución de los intermediarios biosintéticos (Rubio-Piña y Vázquez-Flota 2013). Se ha descrito que la biosíntesis de algunos alcaloides, incluyendo del tipo ABI, involucra la participación de diferentes grupos de células definidas, entre las cuales algunas están destinadas a generar los transcritos de los genes biosintéticos, mientras que otras están especializadas en albergar a las enzimas involucradas en la ruta biosintética y un grupo final se encarga de almacenar a los alcaloides (Facchini y St-Pierre, 2005).

En plantas productoras de ABIs, la localización de los sitios de biosíntesis a nivel celular se limita a dos especies; *Papaver somniferum* y *Thalictrum flavum*. En este trabajo se describe la localización celular de los sitios de acumulación de los alcaloides analizados por microscopía de fluorescencia y la localización celular de los sitios de biosíntesis por la hibridación *In situ* mediada por RT-PCR en cortes histológicos de *A. mexicana*.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 *Argemone mexicana*

Argemone mexicana (Papaveraceae) es una planta anual, herbácea, reconocida por sus propiedades medicinales (Figura 1A). Esta planta presenta hojas lobuladas, verdeazuladas, con una espina apical cada lóbulo (Figura 1B) (Bosch 2007). El tallo es monopoidal, erecto con abundantes espinas alcanzando una altura en promedio de un metro (Figura 1C). La raíz es de tipo pivotante (Figura 1D), los frutos son cápsulas alargadas espinadas y la flor es hipógina de color amarillo (Figura 1E). Dentro de los frutos se desarrollan semillas, redondas, con una corteza cóncava y de tonalidad oscura (Figura 1F). De toda la planta emana un látex característico de color amarillo (Figura 1G) (Pitty y Muñoz, 1993; Rubio Piña y Vázquez Flota, 2013). Aunque se le considera una maleza, la importancia de esta planta se debe a sus usos medicinales y existen referencias de su uso en el tratamiento de nubes o cataratas, para aliviar fiebres, la sarna, como purgante y para ciertas enfermedades cutáneas provenientes de diversas culturas, a lo largo del tiempo (Lozoya, X. 1999).

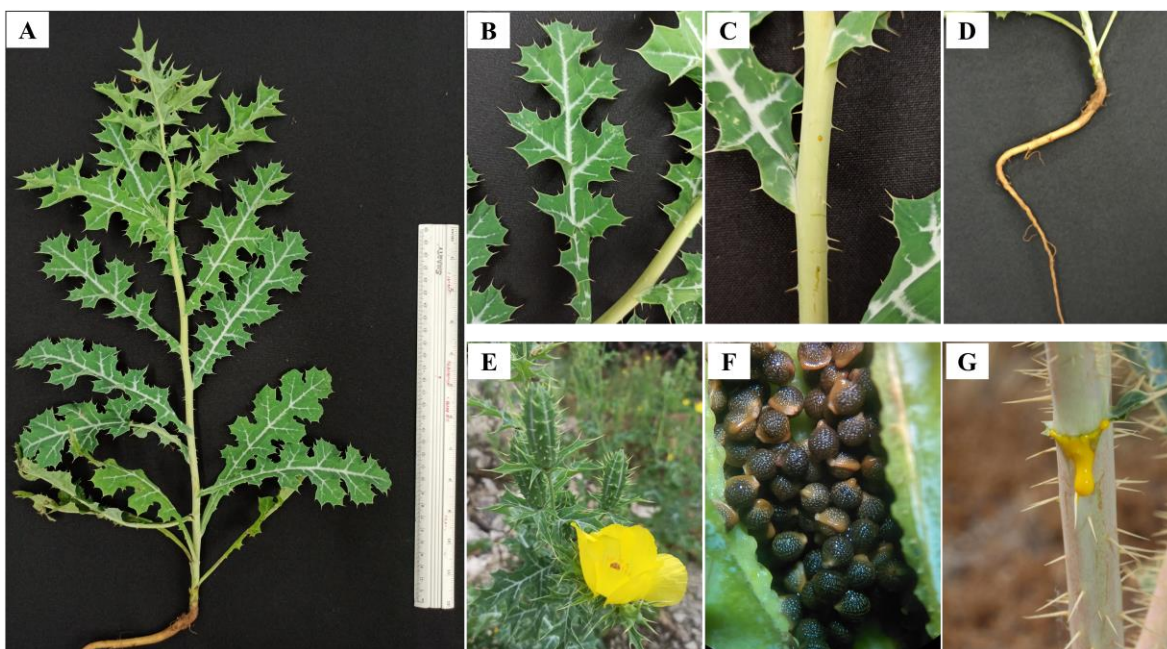


Figura 1. Planta de *A. mexicana*. Se muestra una planta adulta (A) y sus principales componentes: hoja (B), tallo (C), raíz (D), cápsula y flor (E), semillas (F) y látex (G).

Esta planta, comúnmente nombrada cardosanto, chicalote o amapola espinosa mexicana (*Mexican prickly poppy* en inglés y *pavot épineux* en francés), probablemente deba sus propiedades medicinales a la presencia de diferentes alcaloides. Los alcaloides producidos en esta planta pertenecen al grupo de bencilisoquinólicos (ABIs) (Martínez, 1979). Los alcaloides mayoritarios encontrados en *A. mexicana* son la berberina (tipo protoberberina, ver sección 1.4), que está distribuida en todos los tejidos y en semillas de estado inmaduro (Figura 2) (Bramhachari et al., 2013) y la sanguinarina (tipo benzofenatridina, ver sección 1.4), que se presenta en la raíz y en semillas en etapas maduras (Figura 2) (Rubio-Piña, 2009; Lozoya y Lozoya, 1982). En *A. mexicana* también se pueden encontrar otros alcaloides minoritarios como la reticulina, metilcoclaurina, criptopina, queleritrina, dihidrosanguinarina, protopina, alocriptopina, quelantifolina, dihidroqueleritrina, norqueleritrina, coptisina, norsanguinarina, por mencionar algunos (Guizar-González et al., 2012; Rajvaidhya et al., 2012).

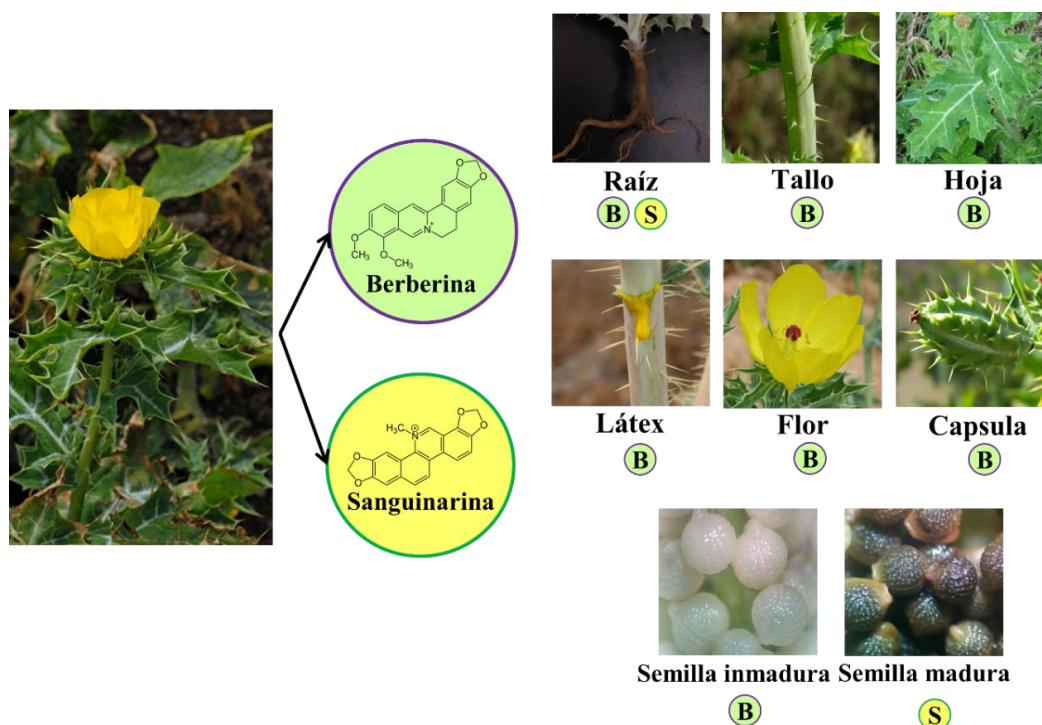


Figura 2. Distribución tisular de los alcaloides producidos por *A. mexicana*. La berberina (B) se distribuye en los tejidos de la raíz, el tallo, la hoja, el látex, flor, y semilla inmadura. La sanguinarina (S) tiene presencia en raíz y semillas maduras.

1.2 Importancia de los alcaloides sanguinarina y berberina.

Desde épocas antiguas las plantas medicinales han tenido un papel muy importante en la medicina tradicional. En el caso del cardosanto (*A. mexicana*), se tienen reportes que la planta se empleaba para eliminar las verrugas genitales y otras infecciones de la piel (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013). Por la abundancia de alcaloides en sus tejidos, se sugiere que estos son los que le confieren las propiedades curativas. La sanguinarina (Figura 2) ha sido la benzofenantridina (ver sección 1.4) más estudiada mostrando una actividad disuasoria contra herbívoros, así como efectos antimicrobianos (Salmore y Hunter, 2001; Liu et al., 2009). Los efectos fisiológicos que ejerce la sanguinarina se atribuyen, al menos en parte, a la configuración plana de su estructura, que le permite intercalarse entre los ácidos nucleicos (Singh y Sharma, 2018).

Una manera de explicar el mecanismo de acción de la sanguinarina es que, por ser un alcaloide, éste modifica su comportamiento químico en función al pH del entorno. En condiciones alcalinas se comporta como una alcanolamina sin carga, capaz de difundirse a través de la membrana de los organelos, pero manteniéndose como una molécula inactiva, de toxicidad baja precisamente por la ausencia de carga. No obstante, al encontrarse en un medio ácido, como podría ser en la inmediación de los ácidos nucleicos, podría actuar como un catión iminio hidrofílico polar, adoptando una forma activa y afectando tanto la biosíntesis de DNA como la de RNA (Han et al., 2016).

La sanguinarina reduce la actividad forrajera de las larvas de polillas (palomilla gitana; *Lymantria dispar*, Lepidoptera), inhibiendo las enzimas digestivas a nivel transcripcional (Zou et al., 2019). De hecho, en algunas zonas agrícolas, los extractos de *A. mexicana* se mezclan con los de otras plantas para la elaboración de insecticidas ecológicos (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013). También tiene efecto antimicrobiano contra *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas lachrymans* y *Xanthomonas vesicatoria* interfiriendo en el ensamblaje de proteínas involucradas en la citocinesis dificultando la fisión bacteriana (Beuria et al., 2005).

Un uso comercial de la sanguinarina es como aditivo en el alimento para ganado ya que, en conjunto con otros alcaloides, reduce las infecciones intestinales y mejora la digestión (Dong et al., 2021). Aunque hay abundantes trabajos de los efectos tóxicos de la sanguinarina contra bacteria y hongos en cultivos de tejidos, el papel específico que podría tener la sanguinarina en semillas de *A. mexicana* aún se desconoce porque no se han realizados estudios en plantas, pero se sugiere que podría actuar como una defensa contra los herbívoros debido a su alta toxicidad (Laines-Hidalgo et al., 2022). Parte de estos efectos se deben a que este alcaloide detiene el ciclo celular entre las fases S y G1 al interferir con las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK; Singh y Sharma, 2018). Las diferentes actividades fisiológicas de sanguinarina y otras benzofenantridinas, así como sus aplicaciones se revisaron para la elaboración de un artículo titulado “An Update of the Sanguinarine and Benzophenanthridine Alkaloids’ Biosynthesis”, publicado en *Molecules* 27 (4), 1378 y que se incluye como el Anexo I.

Por su parte, la berberina (Figura 2) ha demostrado ser un compuesto bioactivo prometedor para el tratamiento de la diabetes tipo 2 ya que tiene efectos hipoglucemiantes, pero únicamente en condiciones de hiperglucemia. Estos efectos se relacionan con un aumento en la fosforilación de los transportadores de glucosa GLUT1 y en la actividad glucolítica (Xie et al., 2022). Por otro lado, la berberina también tiene actividad antitumoral promoviendo la apoptosis en células leucémicas HL-60 humanas al intercalarse con el ADN de estas células provocando la detención del ciclo celular (Kuo et al., 1995). Otro mecanismo de acción de la berberina en células de cáncer de pulmón consiste en la supresión de la lipogénesis mediante la generación de especies reactivas de oxígeno y la activación de la vía proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK por sus siglas en inglés; Fan et al., 2018). En general, la berberina inhibe la proliferación celular regulando el ciclo celular, la autofagia y promoviendo la apoptosis. Más aún, también inhibe la invasión celular y la metástasis suprimiendo la transición epitelial-mesénquimal (EMT) y limitando la expresión de proteínas relacionadas con la metástasis y las vías de señalización relacionadas. Estos efectos se han asociado con la interacción de la berberina *In vitro* con microRNA's,

así como su capacidad de inhibir la actividad de la telomerasa (Wang et al., 2020). La berberina también puede funcionar como un mecanismo de protección intestinal al inhibir la producción de óxido nítrico y citocinas inflamatorias (He et al., 2018). También se ha informado en ensayos *In vitro* que la berberina tiene efectos antimicrobianos al inhibir el crecimiento de *Entamoeba histolytica* (Amin et al., 1969) y un efecto bactericida ya que este alcaloide puede suprimir el crecimiento de *Clostridium difficile* y *Bacillus cereus* al inhibir el crecimiento de las esporas evitando su propagación (Wang et al., 2016).

Una novedosa aplicación biotecnológica de la berberina es su posible uso como sonda al interactuar con estructuras I-motif de DNA ricos en citocinas. Este alcaloide al intercalarse entre las estructuras de los ácidos nucleicos experimenta un aumento en la fluorescencia ideal para la detección de estructuras específicas y localización de secuencias de interés (Xu et al., 2016). También se desarrolló una película de hidrogel cargadas con clorhidrato de berberina y una combinación de diferentes polisacáridos mejorando el proceso de cicatrización de heridas (Cometa et al., 2021). Además de sus propiedades médicas, la berberina también despliega actividad fungicida contra algunos hongos fitopatógenos, ya que *In vitro* redujo el crecimiento de algunos patógenos del arroz como *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Pyricularia oryzae* y *Rhizoctonia solani*. En condiciones de invernadero la berberina mostró una supresión de la enfermedad de la mancha marrón de la hoja (*Cochliobolus miyabeanus*) cuando se aplicó antes de la inoculación del patógeno (Kokkrua et al., 2020).

1.3 Distribución taxonómica de los alcaloides berberina y sanguinarina

Los ABIs se producen principalmente en plantas del orden Ranunculales, en las familias Annonaceae, Aristolochiaceae, Berberidaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Manunculaceae, y Papaveraceae. Los alcaloides de tipo benzofenantridina, como la sanguinarina, queleritrina, coridalina, alocriptopia, entre otros; son típicos de la familia de las Papaveráceas, género al cual pertenece *A. mexicana* (Figura 3), mientras que los de tipo protoberberina se distribuyen principalmente en la familia Berberidaceae y Ranunculaceae.

En especies como *Eschscholzia californica* (Papaveraceae) se ha identificado la presencia única de sanguinarina mientras que, en otros grupos de plantas, como *Coptis japonica* (Ranunculaceae), *Berberis wilsoniae*, (Berberidaceae) y *Fibraurea tinctoriase* (Menispermaceae) son productoras de berberina y otras protoberberinas, pero no son productores de benzofenantridinas (Figura 3) (Preiniger, 1975; Chen y Zhu, 1987; Blanchfield et al., 2003; Liscombe et al., 2005). Es interesante notar que la sanguinarina es común en plantas de la familia Papaveraceae, en las que en pocas ocasiones se observa la berberina, mientras que ésta es regularmente encontrada en las familias Berberidaceae y Ranunculaceas, pero poco frecuente en Papaveraceas. De este modo, *A. mexicana* representa un modelo interesante al combinar ambos alcaloides en sus tejidos.

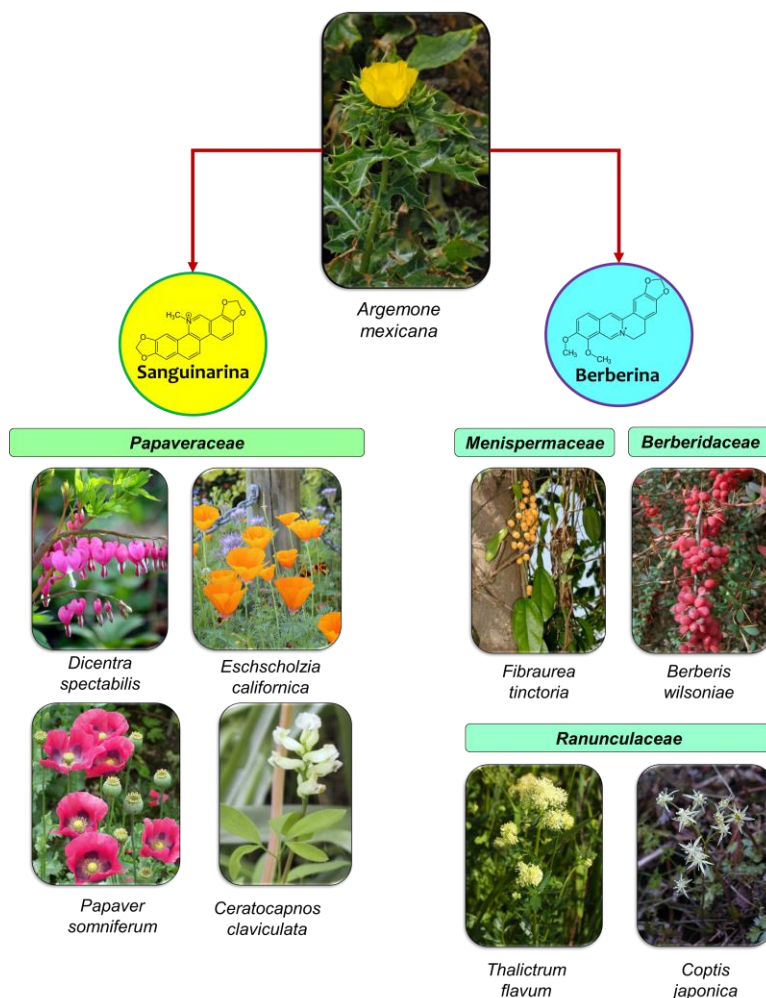


Figura 3. Distribución taxonómica de los alcaloides sanguinarina y berberina.

1.4 Biosíntesis de los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs).

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos nitrogenados, de carácter básico y con efectos fisiológicos en organismos diferentes a los que los producen. Una forma de clasificación es por la molécula precursora, generalmente aminoácidos. Los ABIs se forman a partir de la tirosina y se caracterizan por presentar un esqueleto carbonado central formado por la unión entre un anillo isoquinolínico y un anillo bencílico (Facchini, 2001). El inicio de la ruta de biosíntesis de los ABIs (Figura 4) implica la condensación de dos moléculas derivadas de tirosina. Por un lado, involucra la descarboxilación de la tirosina para producir tiramina, llevada a cabo por la tirosina descarboxilasa (TYDC). La tiramina es convertida en dopamina por acción de la monofenoloxidas (MFO). Una segunda molécula de tiramina es convertida en 4-hidroxifenil acetaldehído (4-HPA) por una monoaminoxidasa (MAO). La dopamina y el 4-hidroxifenil acetaldehído son acoplados en una reacción de condensación, catalizada por la norcoclorina sintasa (NCS), formando la norcoclorina, el intermediario a partir del cual se formarán todos los alcaloides de este tipo. La tabla 1 muestra la localización subcelular de estas enzimas.

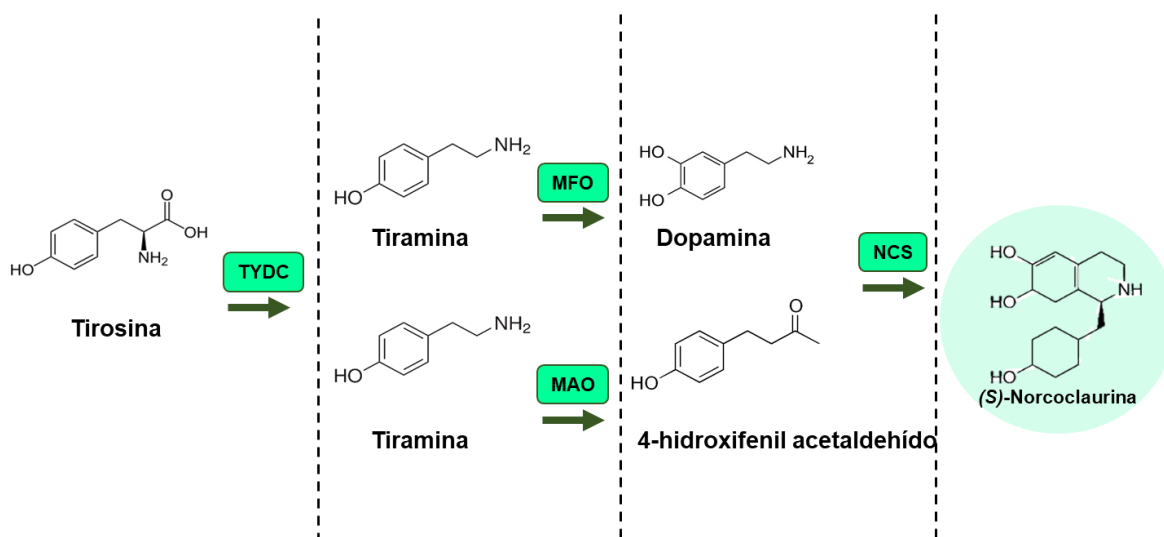


Figura 4. Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs) se forman a partir de tirosina. Tirosina-descarboxilasa (TYDC); monofenoloxidas (MFO); monoaminoxidasa (MAO); norcoclorina sintasa (NCS).

En la fase siguiente de la ruta biosintética (Figura 5), la norcoclaurina se convierte en reticulina mediante una serie de reacciones que incluyen tres metilaciones y una hidroxilación. Las primeras dos metilaciones son catalizadas por las enzimas 6-O-metiltransferasa (6OMT), y coclaurina N-metiltransferasa (CNMT) respectivamente (Frenzel y Zenk, 1990), mientras que la N-metilcoclaurina 3' hidroxilasa (NMCH) se encarga de la hidroxilación (Pauli y Kutchan, 1998). Al final, la 3'-hidroxi-N-metilcoclaurina O-metiltransferasa (4OMT), lleva a cabo la última metilación en esta etapa, para la formación de reticulina (Sato et al., 1994). La tabla 1 muestra la localización subcelular de estas enzimas.

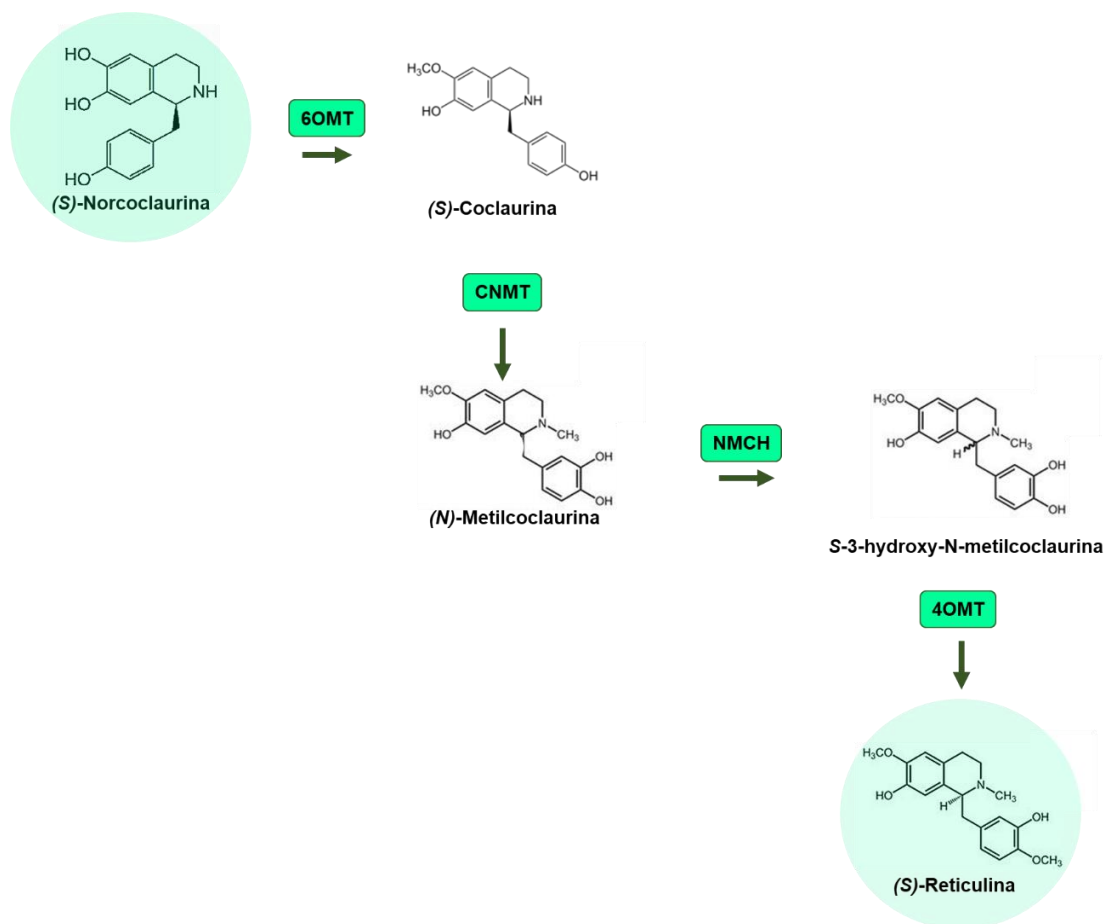


Figura 5. Segunda etapa de la biosíntesis de ABIs. Transformación de norcoclaurina en reticulina. 6-O-metiltransferasa (6OMT); coclaurina N-metiltransferasa (CNMT); (N)-metilcoclaurina 3' hidroxilasa (NMCH), 3'-hidroxi-N-metilcoclaurina O-metiltransferasa (4OMT).

La reticulina es el último intermediario común en la síntesis de los tres grupos principales de ABIs, incluyendo los de tipo benzofenantridina, al cual pertenece la sanguinarina; las protoberberinas, como la berberina y otra más se dirige a la biosíntesis de los alcaloides morfinanos, donde pertenece el alcaloide morfina (Pauli y Kutchan, 1998).

El primer paso para la formación de berberina (Figura 6), implica la desmetilación del N-metilo de la reticulina por acción de la enzima puente de berberina (BBE), formando a la escoulerina (Liscombe y Facchini, 2008). La biosíntesis de berberina (Figura 6) continua con la conversión de la escoulerina en tetrahidrocolumbamina, llevada a cabo por la escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT), seguida por la conversión de ésta en canadina, por la canadina sintasa (CAS). Finalmente, la canadina se oxida a berberina por acción de la (S)-tetrahydroberberina oxidasa (STOX) (Facchini, 2001; Liscombe y Facchini, 2008; De-La-Cruz et al., 2012), la ruta para la formación de berberina implica menos pasos enzimáticos en comparación con la ruta específica para la sanguinarina. La tabla 1 muestra la localización subcelular de estas enzimas.

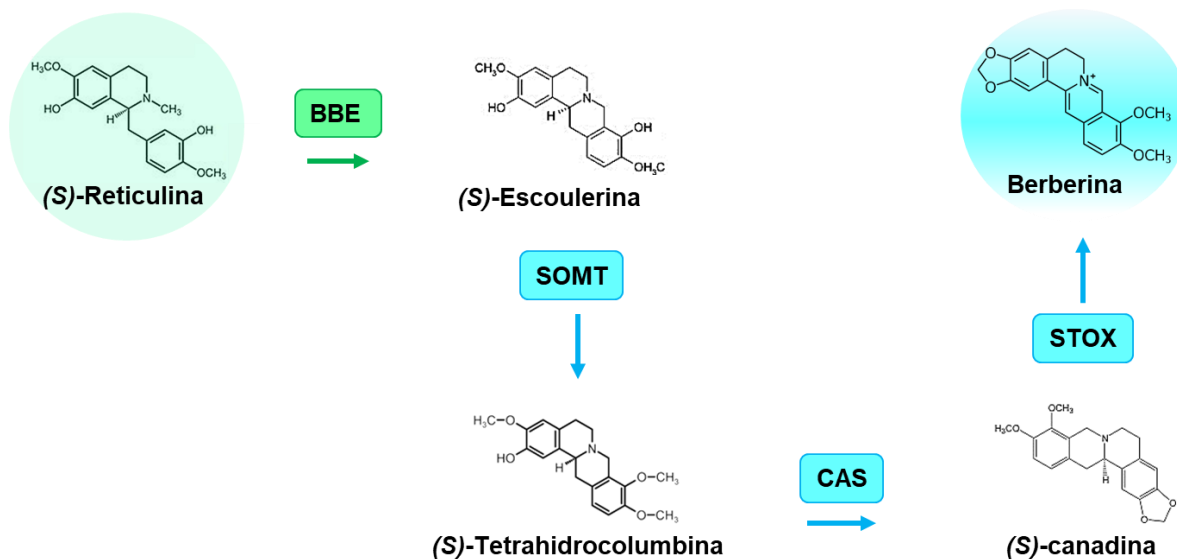


Figura 6. Ruta específica para la biosíntesis de berberina. Enzima puente de berberina (BBE); escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT), canadina sintasa (CAS), S-tetrahydroberberina oxidasa (STOX).

Para la formación de sanguinarina (Figura 7), la escoulerina se convierte en estilopina por la acción consecutiva de dos enzimas oxidasas: la chelantiofolina sintasa (CheSyn) y la estilopina sintasa (StySin). La estilopina después es N-metilada por una enzima llamada tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa (TNMT) y el producto formado, por acción de la cis-N-metilestilopina 14-hidroxilasa (MSH) se transforma en protopina. La conversión de la protopina a hidrosanguinarina involucra una hidroxilación, llevada a cabo por la protopina-6-hidroxilasa (P6H). La dihidrosanguinarina después se convierte en sanguinarina por la dihidrosanguinarina oxidasa (DBOX), por la sanguinarina reductasa (SanR) (De-La-Cruz, et al., 2012; Facchini, 2001). Cabe mencionar que la sanguinarina y berberina comparten muchos de los intermediarios, lo que puede facilitar la producción de ambos alcaloides o generar un cambio en la dirección de biosíntesis para cada alcaloide específico durante el desarrollo de las plantas productoras de ABIs. La tabla 1 muestra la localización subcelular de estas enzimas.

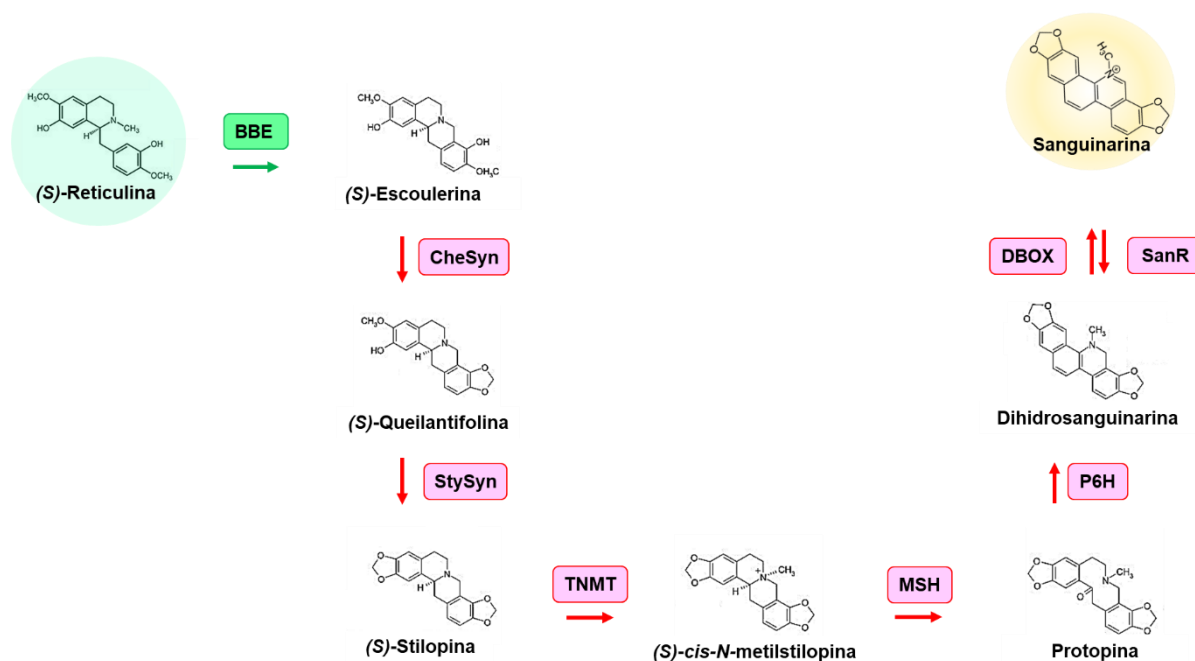


Figura 7. Ruta específica para la biosíntesis de sanguinarina. Enzima puente de berberina (BBE). Para la ruta de sanguinarina: chelantiofolina sintasa (CheSyn), estilopina sintasa (StySin), tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa (TNMT), (S)-cis-N-metilestilopina 14-hidroxilasa (MSH), protopina-6-hidroxilasa (P6H), dihidrosanguinarina oxidasa (DBOX), sanguinarina reductasa (SanR).

Es importante mencionar que estas rutas biosintéticas son comunes en las diferentes especies que producen estos alcaloides, aunque algunas diferencias específicas pueden también existir (Hangel y Facchini, 2012). En *A. mexicana* existe una enzima dependiente de citocromo P450 (CYP719A13) que podría funcionar tanto como estilopina y canadina sintasa ya que *In vitro* acepta en casi la misma medida a la queilintifolina como a la tetrahidrocolumbamina como sustratos, pudiendo así actuar como una enzima bifuncional en la síntesis de sanguinarina y berberina, respectivamente (Díaz-Chávez et al., 2011; Laines-Hidalgo et al., 2022). Candidatos para todos estos pasos se han encontrado en el transcriptoma de plántulas de *A. mexicana* recientemente (Serrano-Gamboa et al., sometido).

Para un mejor panorama de este proceso, la figura 8 muestra, de manera condensada, la ruta de biosíntesis de los alcaloides berberina y sanguinarina. Se ilustran los pasos enzimáticos involucrados en la formación del primer y último intermediario del tramo común, así como de los tramos que conducen de manera específicas se muestra el primer producto de la ruta, así como el producto final. En los recuadros tenemos a las enzimas formadoras de estos productos, cuyos respectivos genes formaran parte de los análisis presentados en este trabajo.

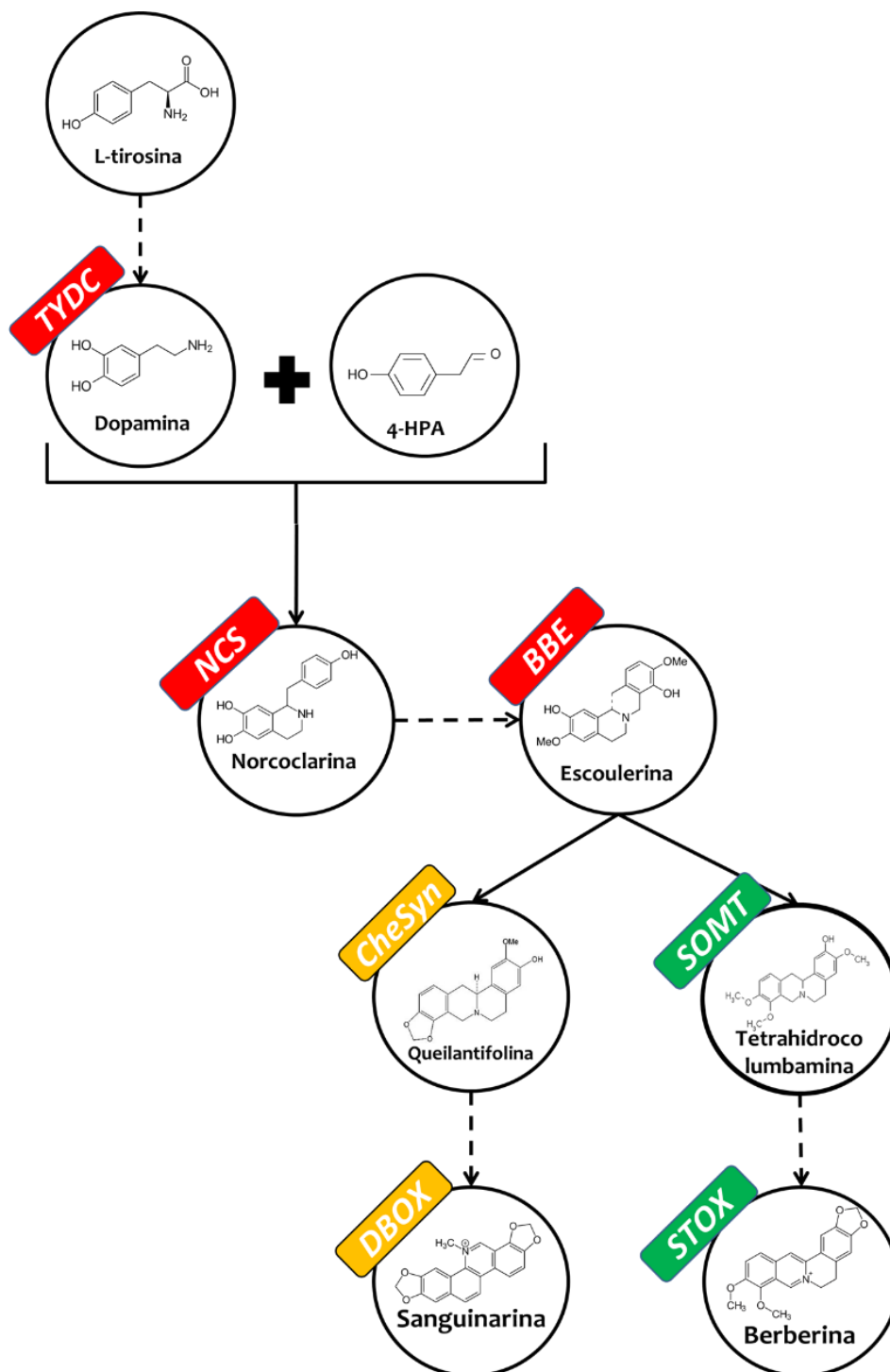


Figura 8. Ruta condensada de la síntesis de los alcaloides berberina y sanguinarina. En los círculos muestran las estructuras químicas de los intermediarios y los recuadros las abreviaciones de las enzimas biosintéticas involucradas. Las abreviaciones se definen en las figuras 3, 4, 5 y 6 de este documento.

1.5 Distribución tisular de los ABIs en *A. mexicana*.

La distribución de la vía de biosíntesis de alcaloides en *A. mexicana* depende en parte del estado de desarrollo y esto se asocia con la distribución de los alcaloides (Xool-Tamayo et al., 2016; Vázquez-Flota et al., 2018). En las siguientes secciones se discute la distribución de las enzimas en diferentes etapas del desarrollo de esta planta.

1.5.1 La capacidad biosintética en etapas tempranas de *A. mexicana*. Durante la germinación de plántulas de *A. mexicana* tanto los cotiledones como las radículas, son capaces de acumular berberina y sanguinarina (Xool-Tamayo et al., 2016). Esto contrasta con las plantas maduras que, únicamente acumulan sanguinarina en la raíz y en semillas maduras (Figura 2) (Vázquez-Flota et al., 2018). Los análisis de expresión mostraron que la radícula tuvo los mayores niveles de expresión de los genes de la ruta común (*TyDC*, *NCS*, *BBE*) y de las rutas específicas para tanto berberina (*SOMT*, *STOX*) como sanguinarina (*CheSyn*, *DBOX*). En comparación, los niveles de expresión fueron casi nulos en los cotiledones. Todos estos datos sugieren que las plantas de *A. mexicana* desde etapas tempranas, la parte radicular es el sitio de biosíntesis mientras que los cotiledones son tejidos en los que preferencialmente se acumulan los alcaloides a donde llegan por un posible mecanismo de transporte (Xool-Tamayo et al., 2016).

1.5.2 Los sitios de biosíntesis y la distribución tisular de los alcaloides en plantas adultas de *A. mexicana*. Las cantidades de sanguinarina, y otros alcaloides como dihidrosanguinarina, berberina y queleritrina, así como los niveles de expresión de los genes involucrados en su biosíntesis también fueron evaluados en plantas adultas de *A. mexicana* (Vázquez-Flota et al., 2018). La berberina fue el alcaloide predominante en los tejidos aéreos (tallo y hoja), mientras que en las raíces se mostraron enriquecidas con la presencia de berberina, sanguinarina, dihidrosanguinarina y queleritrina. Se evaluó la acumulación de los transcritos involucrados en el tramo común (*TyDC*, *NCS*, *BBE*) (Figura 8) y de la ruta específica para berberina (*SOMT*, *STOX*) y los exclusivos para sanguinarina (*CheSyn*, *DBOX*). Los niveles de expresión fueron superiores en los tejidos aéreos,

en comparación que los de la raíz, sugiriendo que en plantas adultas la zona aérea es el principal sitio de biosíntesis, con la raíz pudiendo actuar tanto como sitio de síntesis y acumulación de alcaloides (Vázquez-Flota et al., 2018). Los estudios realizados en *A. mexicana*, tanto en etapas juveniles como adultas sugieren que existen discrepancias entre los sitios de biosíntesis de alcaloides y en los sitios de acumulación. Todo esto conlleva a cuestionarse qué tan compleja resultará la organización y la modulación de la biosíntesis de alcaloides en cada especie, y la compleja organización entre el grupo de células específicas encargadas de la biosíntesis, la acumulación y en el tráfico de estos alcaloides.

1.5.3 La biosíntesis de alcaloides en cultivos *In vitro* de *A. mexicana*.

Los cultivos *In vitro* indiferenciados de *A. mexicana* no muestran la capacidad de producir berberina, pero sí de acumular sanguinarina y dihidrosanguinarina (Trujillo-Villanueva et al., 2010; Vázquez-Flota et al., 2018). En callos de *A. mexicana*, sin la necesidad de ningún inductor, los niveles de sanguinarina por mg materia seca logran valores similares a los encontrados en las raíces de plantas intactas. Por otra parte, en estos mismos callos sólo se detectaron cantidades trazas de berberina (Guízar-González et al., 2012). Estos resultados difieren de lo reportado para líneas celulares de *Sanguinaria canadensis*, *Papaver somniferum* y *E. californica*, que requieren exposición a inductores del metabolismo secundario para acumular cantidades significativas de sanguinarina (Archambault et al., 1996; Ignatov et al., 1999; Weiss et al., 2006).

Estos reportes sugieren que ciertos metabolitos, tal es el caso de la berberina, requieren de tejidos específicos para ser biosintetizados. Por otro lado, la observación microscópica por fluorescencia de suspensiones celulares de *A. mexicana* a una longitud de 470 nm mostró áreas fluorescentes bien definidas alrededor de los núcleos y en la periferia celular. Debido a que los ABIs tienen la capacidad de emitir fluorescencia, es posible que esto se deba a la acumulación de los alcaloides en estas zonas (Trujillo-Villanueva et al., 2012) (Figura 9). Aunque la sanguinarina es altamente tóxica, la presencia al interior de la célula sugiere la operación de un mecanismo de desintoxicación. De hecho, se ha propuesto que la

reducción de la sanguinarina a dihidrosanguinarina, una forma menos tóxica, en asociación con un sistema de excreción mediado por vesículas y que libera el exceso de alcaloides al exterior podría operar en condiciones que conlleven el aumento de las cantidades de este alcaloide (Weiss et al., 2006; Alcantara et al., 2005; Sirikantaramas et al., 2008). La ausencia de ciertos alcaloides y de sus respectivos transcritos biosintéticos en cultivos *In vitro*, indica que la biosíntesis de estos metabolitos en las plantas es altamente tejido-dependiente, involucrando la participación de distintos tejidos, diferentes tipos de células y diferentes compartimentos celulares, debido a la naturaleza química de cada intermediario participante en la biosíntesis de los alcaloides (Beaudoin y Facchini, 2013).

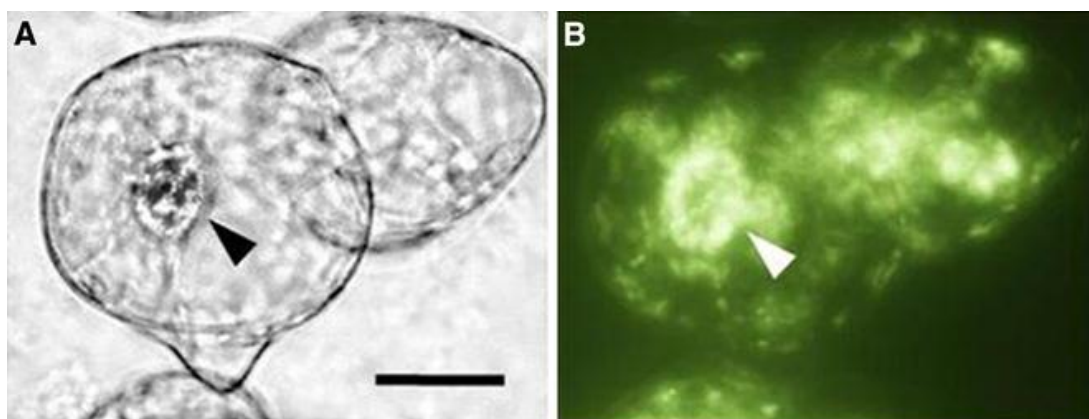


Figura 9: Localización intracelular de sanguinarina en cultivos de *A. mexicana*. A): célula observada bajo luz visible. B): Autofluorescencia de suspensiones de *A. mexicana* después de 120 h del tratamiento secuencial. La emisión de benzofenantridinas (sanguinarina) (520 nm) aparece como áreas verdes bajo excitación a 470 nm. La punta de flecha apunta al núcleo celular (Trujillo-Villanueva et al., 2012).

1.6 Biosíntesis, tráfico y acumulación de los ABIs

1.6.1 Metabolismo intracelular de los ABIs. La biosíntesis de los ABIs consta de múltiples reacciones enzimáticas. La biosíntesis de alcaloides puede presentar diferentes grados de complejidad involucrando la participación de distintos tejidos para el tráfico de los alcaloides. A un nivel inferior, grupos de células específicas se encargan de la biosíntesis y de la acumulación de alcaloides (Ziegler y Facchini,

2008). A nivel intracelular la biosíntesis de ABIs toma diferentes compartimentos. En *P. somniferum*; las enzimas para la biosíntesis del alcaloide sanguinarina se ubican espacialmente distribuidas en el citosol, entre el lumen y la membrana del retículo endoplásmico. El almacenamiento ocurre en la vacuola por medio del tráfico de vesículas (Beaudoin y Facchini, 2014). En la Tabla 1 se muestran las enzimas involucradas en la biosíntesis de sanguinarina, y de berberina y su respectiva localización subcelular.

Tabla1: Localización celular de las enzimas involucradas en la biosíntesis de sanguinarina y berberina. Los datos se recopilieron de UniProt Beta (<https://beta.uniprot.org/>)

| Enzima y clasificación | Función | Localización celular | Organismo y número de acceso | Referencia |
|---|--|------------------------------------|--|---|
| Ruta común | | | | |
| Tirosina descarboxilasa (TyDC) EC 4.1.1.25 | Descarboxila a la L-tirosina para producir tiramina. | Citosol | - <i>P. somniferum</i> (P54768) - <i>T. flavum</i> (Q9AXN7) - <i>A. mexicana</i> (D2SMM8) | Facchini y De Luca, 1994. Samanani et al., 2005. |
| S-norcoclaurina sintasa (NCS) EC 4.2.1.78 | Condensa a la dopamina con la 4-hidroxifenilacetaldehído produciendo S-norcoclaurina. | Retículo endoplásmico y vacuola | - <i>P. somniferum</i> (Q4QTJ2) - <i>T. flavum</i> (Q67A25) - <i>A. mexicana</i> (EU881891) | Samanani et al., 2001. Samanani et al., 2004. |
| (S)-norcoclaurina-6-O-metiltransferasa (6OMT) EC 2.1.1.128 | Transfiere un grupo metilo a partir de SAM para formar los siguientes productos: S-norcoclaurina, coclaurina (R, S)-norcoclaurina, (R)-norprotosinomenina, (S)-norprotosinomenina and (R, S)-isoorientalina. | Proteína integral de la membrana | - <i>P. somniferum</i> (Q6WUC1) - <i>C. japonica</i> (Q9LEL6) | Ounaron et al., 2003. Sato et al., 1994. |
| Reticulina oxidasa: berberine bridge enzyme (BBE) EC:1.21.3.3 | Convierte a la S-reticulina en S-escoulerina mediante un enlace carbono-carbono (C8) entre el grupo N-metilo y el anillo fenólico. | Vesículas citoplasmáticas | - <i>P. somniferum</i> (P93479) - <i>E. californica</i> (P30986) - <i>A. mexicana</i> (D2SMM9) | Facchini et al., 1996. Hauschild et al., 1998. |
| Ruta específica de la berberina | | | | |
| (S)-escoulerina-9-O-metiltransferasa (SOMT) EC:2.1.1.117 | Convierte a la (S)-escoulerina en (S)-tetrahydrocolumbamina (THC). | Retículo endoplásmico | - <i>P. somniferum</i> (I3V6A7) - <i>C. japonica</i> (Q39522) | Winzer et al., 2012. Takeshita et al., 1995. |
| (S)-canadina sintase (CYP719) EC:1.14.19.68 | Convierte a la (S)-tetrahydrocolumbamina (THC) en (S)-tetrahydroberberina (THB) también nombrada (S)-canadina. | Membrana del retículo endoplásmico | - <i>C. japonica</i> (Q948Y1) - <i>E. californica</i> (Q50LH4) - <i>A. mexicana</i> (B1NF19) | Ikesawa et al., 2003. Ikesawa et al., 2007. Chávez et al., 2011 |
| (S)-tetrahydroprotoberberina oxidase (STOX) EC:1.3.3.8 | Convierte a la tetrahydroprotoberberina en berberina. | Vesículas citoplasmáticas | - <i>C. japónica</i> (E3WDH1) - <i>B. wilsoniae</i> (F1BVB6) | Okada et al., 1989. Gesell et al., 2011. |
| Ruta específica de la sanguinarina | | | | |
| Queilantifolina sintasa (CheSyn) EC:1.14.19.65 | Convierte a la (S)-escoulerina en (R, S)-queilantifolina. | Membrana del retículo endoplásmico | - <i>E. californica</i> (B5UAQ8) - <i>A. mexicana</i> (CYP719A14) | Ikezawa et al., 2009. Chávez et al., 2011. |
| Estilopina sintasa | Forma un puente metilenedioxy | Membrana del | - <i>E. californica</i> | Ikesawa et al., 2007. |

| | | | | |
|--|---|------------------------------------|---|--|
| (StySyn) EC:1.14.19.73 | sobre el anillo A (posición 2,3) de los sustratos. Participa en la conversión de la (S)-queilantifolina en (S)-estilopina, también participa convirtiendo a la (S)-escoulerina en (S)-nandinina y a la (S)-tetrahydrocolumbamina en (S)-canadina. | retículo endoplásmico liso | (Q50LH4) - <i>A. mexicana</i> (B1NF19) | Chávez et al., 2011. |
| (S)-tetrahydroprotoberberina N-metiltransferasa (TNMT) EC:2.1.1.122 | Convierte a la estilopina, canadina, y la tetrahydropalmatina en sus correspondientes productos N-metilados. | Citosol | - <i>P. somniferum</i> (Q108P1) - <i>E. californica</i> C3SBS8 | Liscombe et al., 2007. Liscombe et al., 2009. |
| Metiltetrahydroprotoberberina 14-monooxigenasa (MSH) EC:1.14.14.97 | Cataliza la conversión de alcaloides de protoberberina N-metilados N-metilestilopina y N-metilcanadina en protopina y alocriptopina, respectivamente. | Proteína integral de la membrana | - <i>p. somniferum</i> (L7X3S1) | Beaudoin et al., 2013. |
| Protopina 6-hydroxilasa (P6H) EC:1.14.14.98 | Cataliza la conversión de protopina y alocriptopina en dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina, respectivamente. | Membrana del retículo endoplásmico | - <i>E. californica</i> (F2Z9C1) - <i>P. somniferum</i> (L7X0L7) | Takemura et al., 2013. Beaudoin et al., 2013. |
| Dihidrobzenofenandrina oxidasa (DBOX) EC 1.5.3.12 | Cataliza una oxidación de dos electrones de dihidrosanguinarina, formando sanguinarina | Retículo endoplásmico | <i>P. somniferum</i> (AAC61839) | Hagel et al., 2012. |
| Sanguinarina reductasa (SanR) EC:1.3.1.107 | Cataliza la reducción de las benzofenandrininas, preferentemente sanguinarina, a los correspondientes dihidroalcaloides. Interviene en la desintoxicación de las fitoalexinas producidas por la propia planta. | Vacuola | - <i>E. californica</i> (D5JWB3) | Weiss et al., 2006. |

1.6.2 La biosíntesis de alcaloides en las plantas involucra la participación de células específicas.

Se ha descubierto una complejidad asombrosa que muestra organizaciones multicelulares como una característica común recurrente para los procesos de biosíntesis y tráfico intercelular de alcaloides. Así en plantas productoras de alcaloides de pirrolizidina, como *Senecio vernalis* y *Eupatorium cannabinum* (Asteraceae), se ha demostrado que las enzimas biosintéticas de los alcaloides pirrolizidina se localizan en la zona de la endodermis cercana a la zona de las células del xilema en raíces del *Senecio* (Figura 10 A). En esta planta, las raíces no acumulan cantidades importantes de alcaloides, a diferencia de las partes aéreas en las cuales se encuentran los mayores niveles. En estos tejidos proporcionan defensa contra diferentes herbívoros. Este hallazgo sugiere que la zona donde son encontradas las enzimas biosintéticas podría facilitar la distribución de alcaloides

hacia los tejidos de la zona aérea, ya que estas enzimas se encuentran cercanas a la médula de la raíz, en donde se hallan los haces vasculares con los elementos conductores (Moll et al., 2002).

Por su parte, en *E. cannabinum*, los alcaloides se acumulan en las raíces y las enzimas biosintéticas se localizan en la corteza de este tejido (Figura 10 B). Esto explica porque las raíces, en contraste con el tallo, es un tejido altamente enriquecido de alcaloides y posiblemente no existe demanda para traslocar los alcaloides, manteniéndose en los sitios de formación, correspondientes a las células de la corteza (Anke et al., 2004).

En plantas de *Catharanthus roseus*, que produce los alcaloides monoterpénicos vincristina y vinblastina, las enzimas biosintéticas se localizan en el parénquima interno del floema asociado al mesófilo (Burlat et al., 2004) (Figura 10 C). De este sitio, los intermediarios biosintéticos son traslocados al floema interno y de aquí a las células de la epidermis y a los idioblastos, alcanzando finalmente a las células laticíferas (Oudin et al., 2007) (Figura 10 C).

Por su parte, en *P. somniferum*, la producción y acumulación de morfina involucra la participación de las células acompañantes del floema, que corresponden a sitios de la transcripción de los genes biosintéticos. No obstante, las células cribosas de este mismo tejido son el sitio donde se traducen las enzimas biosintéticas y finalmente las células laticíferas se encargan de almacenar y traslocar la morfina (Facchini y St-Pierre, 2005) (Figura 10 D).

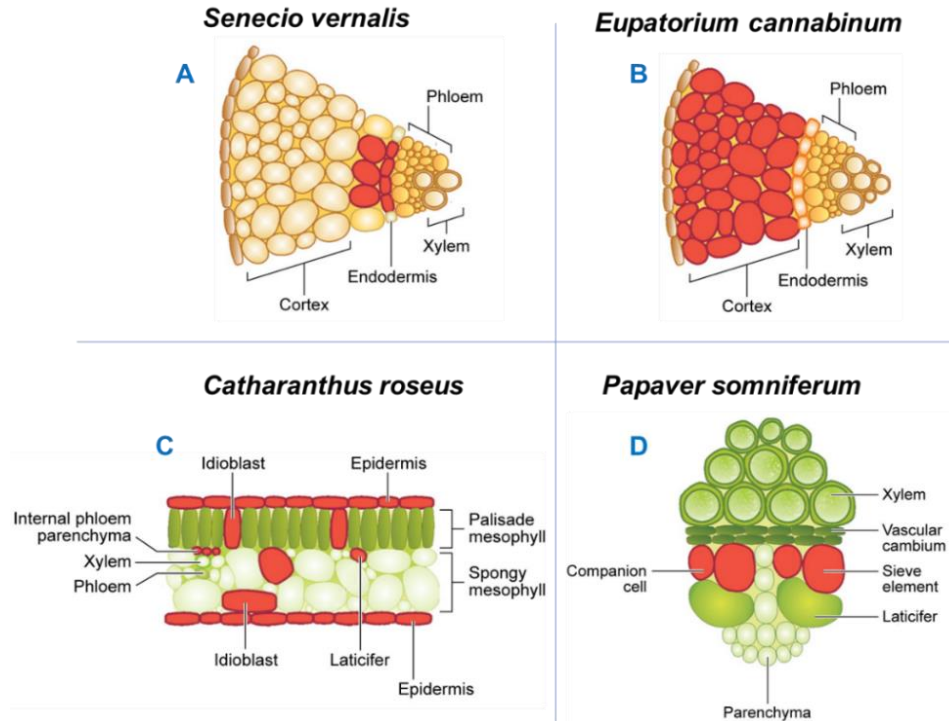


Figura 10. Células especializadas en la producción de alcaloides. En *S. vernalis* las enzimas biosintéticas de los alcaloides pirrolizidina se han localizado en la zona de la endodermis (A). En *E. cannabinum*, las enzimas biosintéticas se localizan en la corteza de la raíz (B). En *C. roseus* las enzimas biosintéticas se localizan en el parénquima interno en la epidermis, en los idioblastos y en las células laticíferas (C). En *P. somniferum* la producción de morfina involucra la participación de las células acompañantes, las células cribosas y las células laticíferas (D). Tomado de Ziegler y Facchini, 2008.

Otra especie productora de ABIs analizada en sus sitios de acumulación y de síntesis de alcaloides aplicando técnicas de hibridación *In situ* fue *Thalictrum flavum*. Por microscopía de fluorescencia se demostró que alcaloides tipo protoberberina se localizaban en la rizodermis de la raíz y en la circunferencia de las células del xilema (Figura 11A). Los análisis de localización de transcritos, mostraron que los involucrados en la ruta común y los específicos para berberina, se encontraban en la zona de la médula de la raíz, específicamente en la endodermis inmadura (Figura 11B) (Samanani et al., 2005).

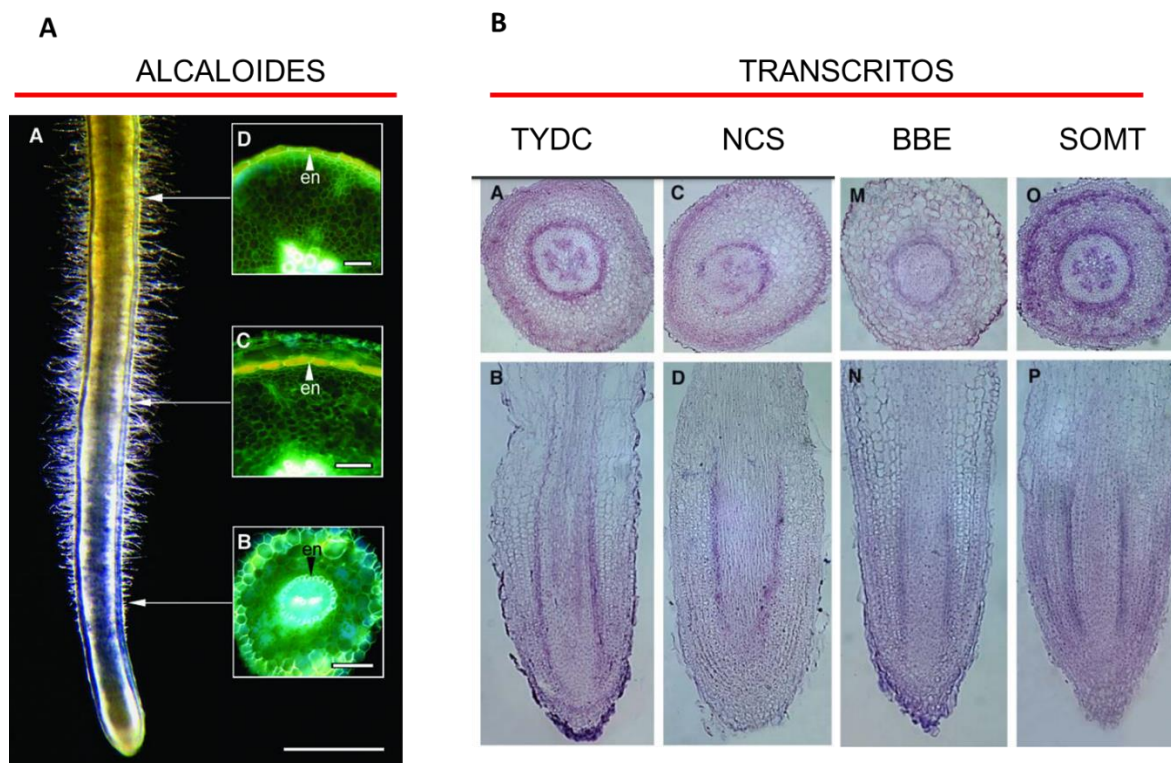


Figura 11. Sitios de acumulación y de biosíntesis de alcaloides en *T. flavum*. A) Los alcaloides fueron localizados en la rizodermis de la raíz y en la circunferencia de las células del xilema. B) Los transcritos de la ruta común y los específicos para berberina fueron localizados en la zona de la medula de la raíz específicamente en la endodermis inmadura (B) tomado de Samanani et al., 2005.

1.7 Panorama general de los estudios realizados en la localización *In situ* de las células específicas biosintéticas de ABIs.

Los avances en la comprensión de los mecanismos de biosíntesis de los ABIs se reflejan en diversas publicaciones que muestran la elucidación de vías metabólicas, el aislamiento de la mayoría de los genes biosintético, la caracterización de enzimas, la elucidación de estructuras químicas y la regulación de la vía biosintética (Beaudoin y Facchini, 2014). Cabe mencionar que la mayoría de estos estudios se han realizados en modelos de cultivos celulares y tejidos completos de especies de la familia Ranunculaceae (*Coptis japonica*, *T. flavum*), Berberidaceae (*Berberis vulgaris*, *Berberis aquifolium*) y Papaveraceae (*A. mexicana*, *Dicentra spectabilis*, *Eschscholzia californica*, *P. somniferum* y *Sanguinarina canadensis*) (Figura12).

Sin embargo, aún restan campos para investigar. Uno son los procesos de transporte específicos a nivel inter e intracelular implicados en el tráfico de ABIs (Shitan et al., 2013). Otro campo que necesita ser investigado es la localización *In situ* de los ABIs. Estos análisis se restringen sólo a dos especies productoras de ABIs: *P. somniferum* (Onoyovwe et al., 2013) (Figura 10) y *T. flavum* (Samanani et al., 2005) (Figura 12). Aún restan especies interesantes productoras de ABIs como *A. mexicana* donde la localización *In situ* de los sitios de biosíntesis se mantiene inexplorada. En plantas productoras de alcaloides como *A. mexicana*, los niveles de expresión de los genes biosintéticos están estrechamente relacionados con los niveles de acumulación de alcaloides, pero los sitios de biosíntesis difieren de los sitios de acumulación de alcaloides (Vazquez-Flota et al., 2018). Por otro lado, esta planta presenta la particularidad de acumular ABIs de dos tipos que pocas veces coinciden en una misma especie; tipo benzofenantridina y protoberberina. Esto la hace un modelo interesante sobre los mecanismos que controlan el flujo de los intermediarios comunes entre las dos ramas biosintéticas.

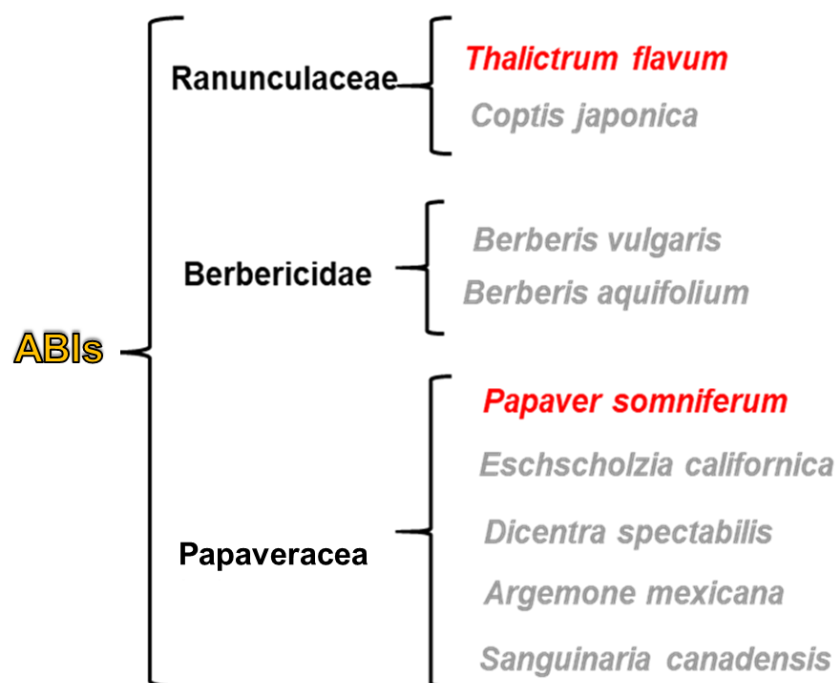


Figura 12. Panorama de los estudios para la localización *In situ* de las células acumuladoras y biosintéticas de ABIs. Los avances en la comprensión de los mecanismos de biosíntesis de los ABIs se han realizado en cultivos celulares y tejidos completos de las especies enlistadas.

1.8 Recapitulación de los antecedentes.

A. mexicana, comúnmente nombrada cardosanto, es una planta productora de ABIs, siendo la sanguinarina y la berberina los que se acumulan en mayores cantidades. En esta planta, la berberina está presente en todos los tejidos, por su parte la sanguinarina tiene presencia en raíz y en semillas de etapas maduras. La presencia de alcaloides puede explicar las propiedades medicinales de esta planta. Las culturas antiguas empleaban al cardosanto para enfermedades de la piel y en el tratamiento de las cataratas. Hoy en día, los alcaloides de esta planta se han empleado para el tratamiento contra el cáncer y otras enfermedades. Por su actividad antifúngica y antimicrobiana, estos alcaloides también se han empleado para el control de plagas y de fitopatógenos. Aunque otras plantas aspecto importante de *A. mexicana* es que es una planta capaz de acumular a dos alcaloides que se distribuyen taxonómicamente entre distintas familias de plantas.

El inicio de la ruta de biosíntesis de los ABIs implica la condensación de dos moléculas derivadas de la tirosina, seguido de múltiples reacciones hasta la formación de norcoclaurina, donde se encuentra comprometida la primera etapa de la vía de biosíntesis. En la siguiente fase de la ruta biosintética, mediante reacciones de metilación e hidroxilación la norcoclaurina se convierte en escoulerina. La escoulerina es el último intermediario común entre la berberina y la sanguinarina. En esta parte, la ruta de la biosíntesis se ramifica para producir la sanguinarina, y otra rama para formar berberina.

En plántulas de *A. mexicana*, tanto los cotiledones como las radículas son capaces de acumular berberina y sanguinarina. En los análisis moleculares, la radícula es el tejido que muestra mayores niveles de expresión en comparación de con los niveles de expresión, casi nulos, de los cotiledones, mostrando que la parte radicular es el sitio de biosíntesis en etapas tempranas de desarrollo. Por su parte, en plantas adultas, las raíces fueron los sitios de mayor acumulación de alcaloides a pesar de que mostraron la menor acumulación de los transcritos analizados. En tallos se encontró la mayor abundancia de los transcritos, sin embargo, este tejido sólo acumula berberina. Con estos resultados hay discrepancias entre los sitios de

biosíntesis y los sitios de acumulación de alcaloides y que por lo tanto resulta interesante conocer los posibles mecanismos de transporte de alcaloides.

La biosíntesis de alcaloides en las plantas puede presentar diferentes grados de complejidad ya que puede involucrar la participación de distintos tejidos, diferentes tipos y compartimentos celulares. A nivel intracelular, la síntesis de sanguinarina en *P. somniferum* las enzimas biosintéticas se ubican espacialmente distribuidas entre el citosol, el lumen y la membrana del retículo endoplásmico. Al final, la sanguinarina es almacenada en la vacuola mediante vesículas (Alcántara et al., 2005). La síntesis de morfina en esta misma planta involucra a las células acompañantes del floema que son los sitios donde ocurre la transcripción de los genes biosintéticos, las células cribosas que contienen almacenan las enzimas biosintéticas, y las células laticíferas son encargadas de albergar a la morfina, como producto final (Facchini y St-Pierre, 2005).

Los estudios de especies productoras de ABIs se ha centrado principalmente en la caracterización de enzimas, la elucidación de estructuras químicas y la regulación de la vía biosintética mediante cultivos celulares y tejidos completos de especies. Los estudios en la localización de las células específicas biosintéticas de ABIs sólo se restringe a dos especies: *P. somniferum* y *T. flavum*. Aún restan especies interesantes como *A. mexicana* que se mantiene inexplorada.

1.9 Justificación

La producción de alcaloides involucra la participación de diferentes tipos de células y diferentes compartimentos celulares. En *P. somniferum* algunas células como las acompañantes del floema se han especializado para la generación de los transcritos de los genes involucrados en la formación de los alcaloides, mientras que las células cribosas del mismo floema son especializadas en albergar a las enzimas biosintéticas de los alcaloides y las células laticíferas almacenan a los alcaloides. Por otra parte, especies como *C. roseus*, *P. somniferum*, *C. japonica*, *T. flavum* han sido modelos para estudiar la localización celular específica de los sitios de síntesis de alcaloides. Sin embargo, aún restan modelos fundamentales como *A. mexicana* que tiene una doble capacidad biosintética para producir alcaloides bencilisquinolínicos de dos tipos; benzofenantrinas y protoberberinas, distribuidos en distintas familias. Es el caso de la sanguinarina (benzofenatridina) que es un alcaloide típico de las papaveraceas, y la berberina (protoberberina) que se encuentra en familias como Ranunculaceae, Berberidaceae y Menispermaceae. En *A. mexicana* también se reportan discrepancias en los sitios de biosíntesis y en los sitios de acumulación. También es un hecho que la producción de algunos alcaloides, como la berberina, es tejido-dependiente ya que en suspensiones celulares de *A. mexicana* sólo es posible encontrar sanguinarina. Sin embargo, en este modelo el análisis de la localización celular específica para los sitios de síntesis y los sitios de acumulación de alcaloides se mantiene inexplorada. En este trabajo se exploraron mediante cortes histológicos, los sitios de acumulación de alcaloides, así como la localización celular de los transcritos de los genes involucrados en los diferentes tramos de la biosíntesis de ABIs, incluyendo el tronco común, así como marcadores específicos de la síntesis de berberina y de sanguinarina.

1.10 Objetivos

Objetivo general

- Identificar los sitios específicos en la biosíntesis de alcaloides en tejidos de *Argemone mexicana*.

Objetivos específicos

1. Identificar los diferentes tipos celulares en cortes histológicos de *A. mexicana*.
2. Localizar por hibridación *In situ* los transcritos de los genes involucrados en las reacciones comunes (*NCS* y *BBE*) de la biosíntesis de berberina y sanguinarina en tejidos de *A. mexicana*.
3. Localizar *In situ* los transcritos de los genes involucrados en las reacciones específicas en la biosíntesis de berberina (*SOMT*) en tejidos de *A. mexicana*.
4. Localizar *In situ* los transcritos de los genes involucrados en las reacciones específicas en la formación de sanguinarina (*StySyn*) en tejidos de *A. mexicana*.
5. Integración de los resultados en base a los sitios específicos de biosíntesis y su relación con los niveles de expresión de los transcritos involucrados en la biosíntesis de alcaloides.

1.11 Diagrama experimental

Para la realización de este proyecto de investigación, se diseñó un plan de trabajo esquematizado en la figura 13, iniciando con la recolecta del material vegetal a partir de poblaciones silvestres de *A. mexicana*. Luego, los tejidos se colocaron en una solución de fijación, para preservar su integridad y posteriormente ser disectados. Parte de la serie de cortes fue destinada a la identificación de los tipos celulares utilizando tinciones histoquímicas, mientras que otro conjunto de cortes fue destinado para el análisis *In situ* de los sitios de acumulación de alcaloides, mediante microscopía de epifluorescencia. El último grupo de cortes fue empleado para analizar la localización *In situ* de los transcritos biosintéticos mediante la técnica de *In situ*-PCR. Al final, se integraron dichos resultados para discutir y obtener conclusiones acerca de la relación entre los sitios de biosíntesis y los sitios de acumulación de alcaloides en tejidos de *A. mexicana*.

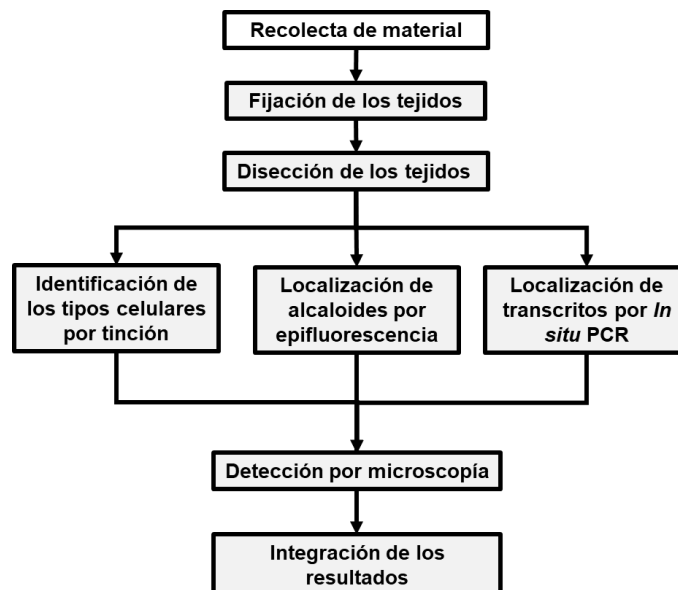


Figura 13. Estrategia experimental. Este trabajo de investigación inició con la recolecta de los tejidos, luego siguió con la disección para obtener cortes histológicos y estos fueron destinados para los análisis de identificación de tipos celulares, el análisis *In situ* de los sitios de acumulación de alcaloides y la localización *In situ* de los transcritos biosintéticos.

CAPÍTULO II

MATERIALES & MÉTODOS

2.1 Material vegetal y almacenamiento.

Plantas de poblaciones silvestres (Figura 14 A) fueron colectadas en diferentes locaciones de Mérida y conservadas en bolsas de polietileno durante su traslado al laboratorio. En el laboratorio, los tejidos se lavaron, primero con agua de la llave y luego con una solución de hipoclorito de sodio comercial diluida al 10 % con agua destilada. Las plantas fueron separadas en hoja, raíz y tallo. Para los análisis de este trabajo, se seleccionaron tallo y hojas del tercio superior de la planta (Figura 14 B). De la hoja, se seleccionó la zona media apical del tejido y de la raíz la zona media (Figura 14 B). Para los análisis moleculares, los tejidos fueron sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su análisis.

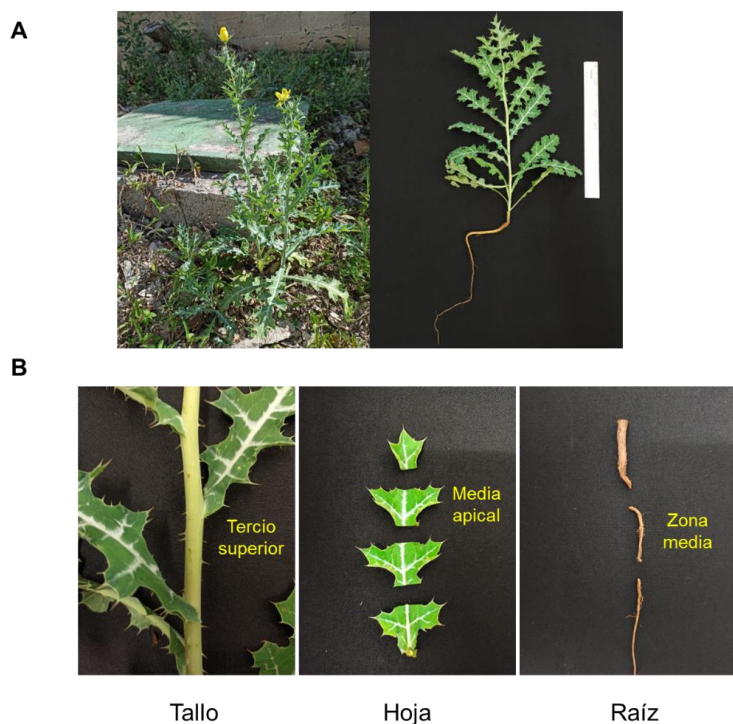


Figura 14. Colecta de material vegetal. A) Se colectaron plantas adultas de *A. mexicana* de poblaciones silvestres de ca. 50 cm de altura. B) para los análisis de este trabajo, se utilizó el tercio superior del tallo, la zona media apical de la hoja y la zona media de la raíz.

2.2 Métodos

La expresión de los genes biosintéticos seleccionados en los tipos celulares se analizó por *In situ* RT-PCR de las secciones de los diferentes tejidos, mientras que la presencia de alcaloides fue detectada por microscopía de fluorescencia directamente en las secciones o por microscopía óptica después de un tratamiento con el reactivo de Dragendorff. Adicionalmente, se empleó la impresión tisular antes de la tinción con este reactivo. Los diferentes tipos de células y tejidos de los órganos analizados se visualizaron al microscopio tras teñirse con azul de toluidina.

2.2.1 Preparación de las secciones de tejidos. Previo a realizar las secciones histológicas, los tejidos se cortaron en cuadrados de ca 1 cm² por lado e incubados en una solución al 10 % de formaldehído como fijador. Después de la fijación, los tejidos fueron deshidratados en soluciones de sacarosa de concentración creciente de 10, 20 y 30 % durante 1.5 h por tratamiento. Los tejidos fueron recuperados y embebidos en la solución crioprotectora Cryo-Gel Leica®, a -20 °C formando una matriz sólida con el tejido al interior. El seccionamiento de los tejidos se realizó colocando la matriz en un criostato Leica CM1950 (Buffalo, E.U.A.) a -30 °C. Se configuró al equipo con la máxima medida de grosor para poder devastar el excedente de matriz. Una vez retirado el excedente, se configuró al equipo para obtener los grosores deseados. Se ensayaron secciones de 50, 40 y 30 μm, que fueron recuperadas en portaobjetos y la integridad se observó en un microscopio óptico de campo claro Leica Zoom 2000 (Tamayo-García et al., 2022).

2.2.2 Identificación de los tejidos en las secciones histológicas. Los diferentes tipos de tejidos fueron identificados en criosecciones de 30 μm de grosor montados sobre cubreobjetos. Sobre la sección se agregaron 100 μL de una solución de azul de toluidina al 1% por 1 min. Después de este tiempo, el excedente se lavó con agua destilada estéril y se dejó secar por 2 min. Luego del secado, las secciones teñidas fueron preparadas con una gota de medio de

montaje DPX sobre la muestra. Se colocó un cubreobjeto y se sellaron los bordes con esmalte de uñas. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Zeiss Axioplan 2 (Oberkochen Alemania) acoplado con la cámara AxioCam CC5 procesados con el paquete AxioVision 4.8

2.2.3 Detección de alcaloides en los diferentes tipos celulares. Para detectar la presencia de alcaloides y otros fitoquímicos en los diferentes tipos celulares, se utilizó microscopía de fluorescencia (Samanani et al., 2002). Crio secciones de 40 μm de grosor se montaron en portaobjetos y se les añadió 100 μL de glicerol. A las muestras se les colocaron los cubreobjetos y se sellaron los bordes con esmalte de uñas. Las crio secciones fueron observadas en un microscopio confocal (Olympus Fluoview FV1000, Tokyo, Japón) empleando una energía de excitación de 405 nm y registrando la emisión de 405, 480 y 550 nm. Los tejidos también se observaron después de ser lavados con metanol. Para ello, los portaobjetos que contenían las crio secciones se colocaron sobre una placa Petri conteniendo 50 mL de metanol. Las placas fueron selladas con Parafilm y puestas en agitación (50 RPM) toda la noche a temperatura ambiente. Posterior a este lavado, los tejidos fueron expuestos de manera manual a un transiluminador de luz UV (Hoefer MacroVue UV-25; San Francisco CA) a 365 nm y observados en un estereomicroscopio Leica Zoom 2000. Para confirmar la presencia de alcaloides, secciones de tejido de ca 1 cm^2 , previamente fijadas con formaldehído (10%) fueron incubadas durante 30 min con en el reactivo de Dragendorff, preparado con 8 g de nitrato de bismuto básico, 20 mL de ácido nítrico y 22.7 g de yoduro de potasio, disuelto en 100 mL de agua (Brechú-Franco, 2016). Después de la incubación, los tejidos fueron embebidos en Cryo-Gel Leica®. Las crio secciones (30 μm) se realizaron con un criostato Leica CM1950 (Buffalo, NY) a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ recuperándolos en portaobjetos. Las secciones fueron observadas y documentadas con el microscopio Zeiss Axioplan 2, acoplado a la cámara AxioCam CC5 procesados con el paquete AxioCat2.

Adicionalmente, los alcaloides fueron localizados por impresión tisular (tissue printing) en tallos, como indicador de berberina, y semillas maduras, como indicador de sanguinarina. Para ello, a partir de porciones frescas de tallo (5 mm de diámetro), tomados de la zona del tercio apical de plantas maduras (Figura 14), se obtuvieron de manera manual con una hoja de bisturí. Por su parte, las semillas maduras se colectaron de cápsulas dehiscentes (estadio 7; Laines-Hidalgo, 2019).

Las impresiones se realizaron colocando los tejidos sobre hojas sílica gel (Merck, Darmstadt, Alemania) recubierta con indicador fluorescente (F254) de 20 cm por 20 cm, colocados sobre papel filtro y una superficie dura, presionado levemente con los pulgares. Los tejidos fueron cubiertos con papel filtro para la impresión. Las huellas impregnadas fueron posteriormente expuestas a irradiación UV de 365 nm y observados en un estéreo microscopio Leica Zoom 2000.

2.2.4 Identificación de los sitios de biosíntesis de alcaloides por hibridación *In situ* RT-PCR. Los sitios de biosíntesis de alcaloides se identificaron por hibridación *In situ* de transcritos de genes biosintéticos. Para ello, se desarrolló una metodología basada en la descrita por Athman (Athman et al., 2014). Las reacciones para la digestión de ADN genómico, síntesis de la primera hebra de cDNA, la amplificación y la tinción se realizaron en cápsulas hechas a partir de tapas de tubos Eppendorf de ultracentrífuga de 2 mL (Figura 15).

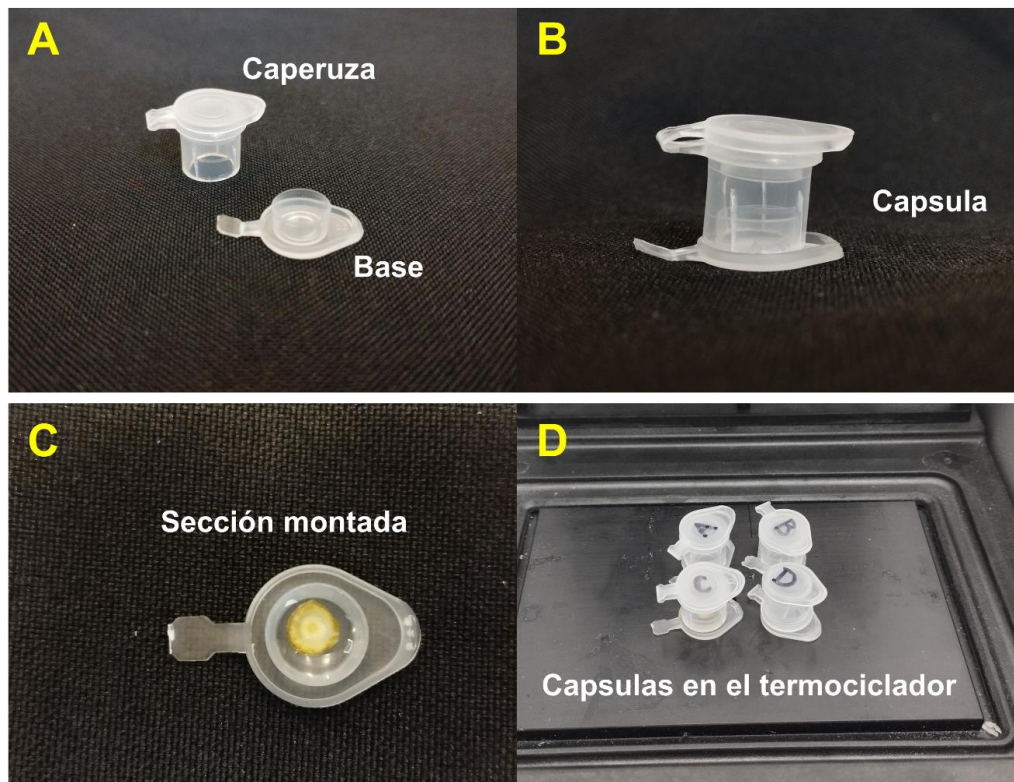


Figura 15: Cápsula de hibridación *In situ*. A) la cápsula es formada a partir de 2 tubos de centrifuga de 2 mL donde se obtiene la caperuza y la base. B) Al ensamblar la caperuza y la base se forma la cápsula de hibridación *In situ*. C) Sobre la base se monta la sección y sobre ellas las diferentes soluciones. D) Las cápsulas con las secciones pueden ser incubadas en el termociclador, protegiendo la muestra.

Las criosecciones fueron colectadas directamente sobre las cápsulas, que contenían previamente 100 μL de agua con DEPC, para los lavados. Para facilitar la toma de reactivos por los tejidos, estos se permeabilizaron con 100 μL de cloroformo por 5 min. Una vez pasado este tiempo, las secciones se lavaron dos veces con 100 μL de PBS 1X por 2 min. La preparación de PBS a 10X consistió en 11.5 g Na_2HPO_4 , 80.6 g NaCl , 2.2 g KCl , 2 g KH_2PO_4 ajustado a pH 7.5 y disuelto en agua estéril. Para preparar una solución a 1X la solución madre se diluyó en un volumen de 1: 10. Durante el proceso de *In situ* RT-PCR, todas las soluciones se agregaron y se retiraron cuidadosamente con una micropipeta, sin tocar la muestra con la punta.

Previo a las amplificaciones, el DNA genómico de las criosecciones se digirió al agregar una mezcla que contenía 1 μL de DNase I set 100 U (1 $\text{u}/\mu\text{L}$) (Invitrogen cat. no:18068015; Waltham, E.U.A.), 5 μL del amortiguador de DNAsa 10X, y 44 μL de agua estéril. Las secciones fueron incubadas en la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente y la reacción se inactivó agregando 1 μL de EDTA (25 mM) e incubando a 65 °C durante 10 min para después ser lavadas con 100 μL de PBS 1X durante 2 min dos veces.

Una vez eliminado el DNA, la síntesis de cDNA, se realizó incubando las secciones a 65 °C durante 5 min en un Termociclador con bloque para análisis *In situ* (Techne cat. no: TC-412.) con una mezcla que contenía 2 μL de oligo (dT)₁₈ Primer 120 μL (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Thermo Scientific cat. No: SO132; Waltham, E.U.A.), 2 μL de dNTP mix (10 mM) y 40 μL agua estéril. Después de ese tiempo, para alinear el iniciador se añadieron 4 μL del amortiguador first-strand 5X, 2 μL de DTT (0.1 M) y 1 μL de RNase OUT 5000 U (40 $\text{u}/\mu\text{L}$) (Invitrogen cat. no: 10777019; Waltham, E.U.A.) y las secciones fueron incubadas a 37 °C por 2 min. La reacción se inició agregando 1 μL de M-MLV reverse transcriptase set 40 000 U (200U/ μL) (Invitrogen cat. no: 28025013; Waltham E.U.A.) y se incubó a 37 °C por 60 min. Transcurrido ese tiempo, la solución se retiró del recipiente con una pipeta y se lavó dos veces con 100 μL de PBS 1X durante 2 min. Como controles negativos, se incluyeron secciones tratadas con RNAsa antes de la síntesis de cDNA. Para ello, las secciones fueron incubadas en una mezcla que contenían 1 μL de RNase A (20 mg/mL) (Invitrogen cat no: 12091021) y 49 μL de agua estéril, la reacción fue incubada a temperatura ambiente por 20 min. Al cabo de este tiempo, las secciones fueron lavadas dos veces con 100 μL de PBS 1X durante 2 min.

Para las amplificaciones de los transcritos correspondientes a los genes *Am-NCS1*, *Am-BBE1*, *Am-SOMT* y *Am-StySyn* (Figura 6 y 7; Tabla 2), las criosecciones se incubaron en una mezcla de PCR que contenía 35 μL de agua estéril, 10 μL de amortiguador de PCR 10X, 1 μL de la mezcla de dNTPs, 1 μL de digoxigenin-11-DUTP, 2 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL de Taq polimerasa (5 U/ μL), 1

μL de oligonucleótido en sentido directo (10 mM) y 1 μL de oligonucleótido en sentido reverso (10 mM). Las condiciones de amplificación incluyeron un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 30 s y 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 25 s a la temperatura de hibridación de los diferentes cebadores (Tabla 2), y 20 s 72 °C para la elongación. Se incluyó un ciclo de elongación final a 72 °C por 2 min. Para las amplificaciones se usó un termociclador con bloque para análisis *In situ* (Techne cat. no: TC-412.). Una vez terminados los ciclos, las secciones histológicas fueron lavadas 2 veces con 100 μL de PBS 1X durante 2 min.

Tabla 2. Diseño de los oligonucleótidos y sus respectivas temperaturas empleados en este protocolo para la amplificación de los genes específicos (Vázquez-Flota et al., 2018).

| Gen | Sentido 5'-3' | Antisentido5'-3' | Tm | Longitud (pb) |
|------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------|---------------|
| <i>Am-NCS1</i> | CATCGCTAATTACGTTCTCAAGA ATCA | ATAGTAGTACATGGAATTACCT GGATGGGA | 61 °C | 241 |
| <i>Am-BBE1</i> | CATCTTTGTTTCATCATCTTCTTCT TCTTCTT | GATCCTCTTGTGCAACATCTAA CGGT | 64 °C | 268 |
| <i>Am-SOMT</i> | CAGGATTTGGACCAGAAGCAC | ACGATACTCCATCCTCCTCGC | 61 °C | 219 |
| <i>Am-StySyn</i> | GTTCAAAATCTAGTACGTCCGCT | TTCTCTTGAACATTTGGTTCTC GT | 56 °C | 200 |

Los amplicones se detectaron por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra la digoxigenina (Roche cat. no: 11093274910; Basilea, Suiza), conjugado con fosfatasa alcalina. Para ello, las secciones histológicas se bloquearon utilizando el paquete comercial “Roche DIG wash and block buffer set” (cat. No: 11585762001). Siguiendo las indicaciones del fabricante, las secciones fueron lavadas con 100 μL del amortiguador de lavado (Washing Buffer) por 5 min y con 100 μL de PBS 1X por 2 min. Luego se agregaron 100 μL de la solución de bloqueo (blocking solution) por 2 h y se agregaron 0.3 μL del anticuerpo anti-digoxigenin dejando en incubación toda la noche. Al final se lavó con 100 μL del amortiguador de detección (detection buffer) por 15 minutos (tres veces).

Para la colorimetría, se diluyó 1 tableta de sustrato para la fosfatasa alcalina NBT/BCIP (Roche cat. no: 11697471001) en 10 mL de una solución de tinción

(Tris 100 mM, MgSO₄ 50 mM, pH 9.5). A partir de esta mezcla, se añadieron 100 µL a cada criosección. Para desarrollar la tinción, las criosecciones se incubaron en oscuridad y se monitoreó hasta la aparición de la señal azul-púrpura (ca. 3 h). Al término de la colorimetría, las criosecciones se lavaron con 100 µL del amortiguador de lavado “Washing Buffer” 1 por 5 min (tres veces). Al final se lavaron con 100 µL de agua estéril por 5 minutos. Las criosecciones se transfirieron cuidadosamente a los portaobjetos agregando una gota de glicerol, colocando cubreobjetos y sellados con esmalte de uñas. Las secciones fueron observadas y documentadas con el microscopio Zeiss Axioplan 2 acoplado con la cámara AxioCam CC5 procesados con el paquete AxioVision 4.8

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Identificación de los tipos celulares en secciones histológicas.

El objetivo principal de este trabajo fue reconocer la organización celular requerida en la biosíntesis y acumulación de los alcaloides en *A. mexicana*. Para ello, fue necesario identificar los tipos celulares que integran los tejidos involucrados. En una primera etapa se realizaron cortes histológicos de diferentes tejidos de plantas maduras que se observaron tras una tinción con azul de toluidina. Este colorante policromático reacciona diferencialmente con los componentes aniónicos de las paredes celulares (Mitra y Loqué, 2014), produciendo diferentes coloraciones, dependiendo de la composición de la pared. De este modo, los polisacáridos carboxilados, como la pectina que es abundante en células con pared secundaria, adquieren una coloración púrpura rosada, permitiendo la identificación de células maduras. Por otro lado, compuestos aromáticos, como la lignina y los taninos, que se acumulan en los vasos leñosos, se tiñen de un tono azul brillante (Mitra y Loqué, 2014). Con el fin de identificar los diferentes grupos celulares, se obtuvieron criosecciones transversales de tallo, raíz y hoja de 30 µm de plantas maduras, de aproximadamente 50 cm de altura y que corresponde a una edad aproximada de tres meses de (Figura 14). Las secciones obtenidas a partir de los tejidos fueron teñidas con azul de toluidina y la descripción de los tipos celulares en los tejidos de *A. mexicana* se realizó por comparación con la organización celular en tejidos de plantas dicotiledóneas (Mitra y Loqué, 2014), así como de plantas productoras de ABIs (Ngernsaengsaruy et al., 2023; Cheng et al., 2015).

3.1.1 Análisis histoquímico de secciones de tallo. Los cortes analizados se tomaron del tercio superior del tallo principal, con un diámetro de aproximadamente 7 mm y de naturaleza flexible (Figura 14). En los tallos de *Argemone*, los haces vasculares se encuentran organizados de la manera típica de las plantas dicotiledóneas (Scarpella y Meijer, 2004). De este modo, los componentes vasculares se agrupan en anillos, distribuidos de manera continua en una banda circular cercana al contorno periférico del tejido (Figura 16 A, flecha

roja) y con dicha banda rodeando las células parenquimatosas de la médula, ubicadas al centro del tejido. Estas células se identifican por su aspecto voluminoso, isodiamétrico y su pobre reacción al colorante, debido a la poca presencia de lignina (Figura 16 B, flecha negra). Por otra parte, en la zona entre la zona vascularizada y la epidermis se observan las células colenquimatosas de la corteza, de aspecto más pequeño, poligonales y sin pared secundaria (Figura 16 B, flecha amarilla). Los haces vasculares normalmente se asocian con fibras de esclerénquima que rodean la parte exterior del anillo vascular, formando una estructura conocida como "tapas del haz" (Figura 16 B, flecha azul). La organización interna del anillo vascular es de tipo colateral, en cuyo interior se encuentran las células del xilema, caracterizadas por una pared celular gruesa, muy reactiva al colorante y su aspecto casi circular de gran diámetro (Figura 16 C, flecha verde). Las células del floema se localizan al exterior del xilema y se distinguen por ser un poco alargadas, y de menor tamaño (Figura 16 C, flecha rosada). El cambium intravascular, formado por células meristemáticas, se localiza entre el xilema y el floema, y consiste entre cuatro y seis capas de células alargadas y pequeñas (Figura 16 C, flecha púrpura). De este modo, los análisis confirmaron la organización característica de una planta dicotiledónea. Es interesante notar que, inmediatamente adyacentes a los vasos más externos del xilema y en parte inferior de la zona cambium vascular, también se observaron células voluminosas y redondas que no se lograron teñir con el colorante (Figura 16 C, flecha naranja). Estas características son propias de las células laticíferas. Y, en ese contexto, es importante recordar que *Argemone* es una planta que produce un látex amarillo, que exuda por los tallos al ser cortados.

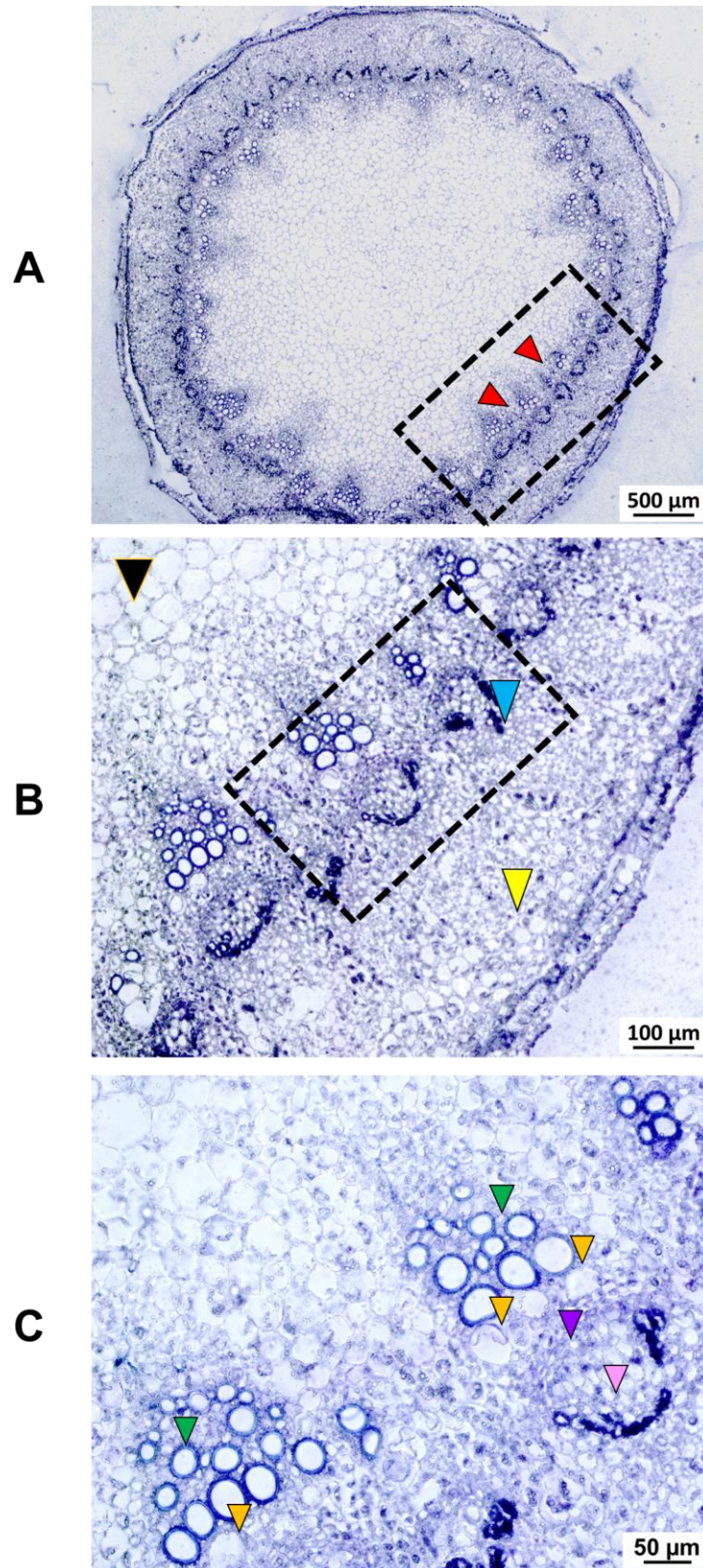


Figura 16. Tinción histoquímica con azul de toluidina de una sección transversal del tallo de *A. mexicana*. A) Sección completa del tercio apical del tallo principal. Las flechas rojas señalan los haces vasculares, organizado en torno a la circunferencia del tallo. B) Amplificación de la zona marcada en el recuadro en A. La flecha negra señala a las células parenquimales de la médula; mientras que las flechas amarilla y azul señalan las regiones de células colenquimatosas y del esclerénquimales, respectivamente. C) Amplificación de la zona marcada en el recuadro en B. Las flechas verdes, rosa y púrpura indican a las células del xilema, del floema, y la región del cambium vascular, respectivamente, mientras que la naranja señala una célula laticífera.

3.1.2 Análisis histoquímico de secciones de raíces. Los cortes analizados se realizaron en la raíz principal, en la zona media aproximadamente a 10 cm por arriba del meristemo radicular (Figura 14). Los cortes mostraron que la raíz de *Argemone* presenta tres niveles de organización transversal, distribuidos en capas concéntricas. La capa más prominente comprende a las células parenquimales de la corteza, en la zona intermedia (Figura 17 A, flecha negra). Esta capa está rodeada por las células de la rizodermis, que se localizan en la periferia del tejido (Figura 17 A, flecha café), mientras que zona central corresponde a la médula, que alberga los haces vasculares (Figura 17 A, flecha roja). Dicha organización es la característica de plantas dicotiledóneas (Parizot et al., 2008). La endodermis, que delimita la corteza de la médula se aprecia como una capa concéntrica de células teñidas (Figura 17 B, flecha verde), localizada adyacente a las células del periciclo (Figura 17 B, flecha azul). Distribuidas al interior del área de la médula se encuentran las células del xilema, organizadas de manera radial y formando el cilindro vascular. Estos conductos se identifican por su gran diámetro y su pared leñosa (Figura 17 C, flecha amarilla) por estar rodeadas por las células del floema, más pequeñas y de aspecto poligonal (Figura 17 C, flecha rosada). Las células del cambium intravascular, de aspecto alargado, se hallan intercaladas entre las células del xilema y floema, organizadas en forma de listón y en dirección radial. A este tipo de células también se le conoce como tejido conjuntivo o complementario (Figura 17 C, flecha púrpura). Este tipo de estructura es el típico de las raíces de plantas dicotiledóneas.

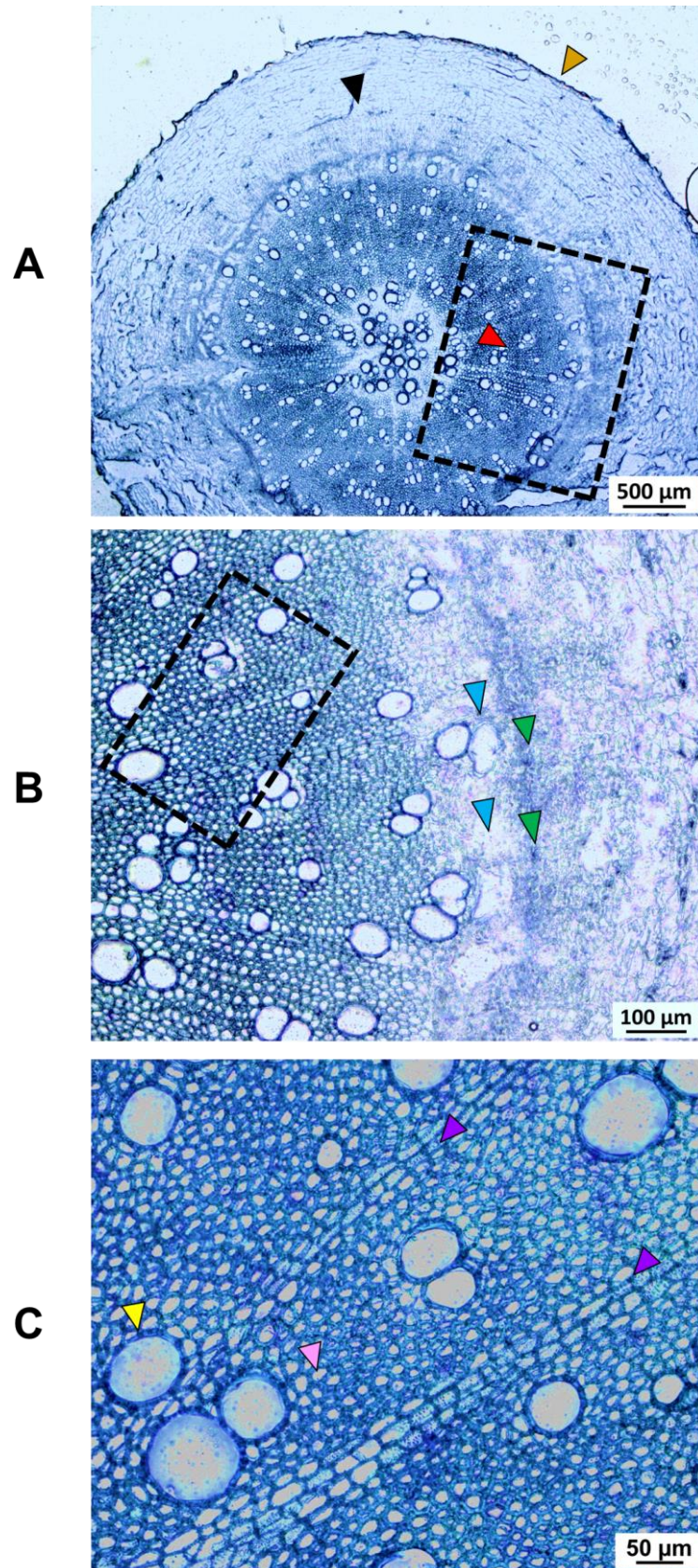


Figura 17. Tinción histoquímica con azul de toluidina de una sección transversal de la raíz de *A. mexicana*. A) Sección completa de la zona media de la raíz. Se observan los niveles de organización de la raíz, con las células de la rizodermis (flecha café) y de las células de la corteza (flecha negra). En la zona central se encuentra el cilindro vascular (flecha roja). B) Amplificación de la zona señalada en el recuadro en A, mostrando la región de la endodermis (flecha verde) y el periciclo (flecha azul). C) Amplificación de la zona señalada en el recuadro en B, mostrando las células del xilema (flecha amarilla), del floema (flecha rosada) y del cambium intravascular (flecha púrpura).

3.1.3 Análisis histoquímico de secciones de hojas. Los cortes analizados se realizaron a partir de hojas totalmente expandidas, tomadas el tercio apical del tallo principal. Los cortes se hicieron en la zona media apical de la hoja (Figura 14). El corte muestra la nervadura central, en la zona adaxial, con la epidermis señalada en la zona abaxial (Figura 18 A, flechas negra y roja respectivamente). En la zona de la nervadura central, se observan las células colénquimatosas del parénquima esponjoso, con un aspecto redondo, isodiamétrico (Figura 18 B, flechas rosas). Rodeando la parte exterior de los haces vasculares, se observan las células fibrosas del esclerénquima (flechas verdes en Figura 18 B). Las células del xilema se distinguen por su pared marcadamente teñida y su gran dimensión (Figura 18 C, flecha amarilla). Adyacentes a éstas, localizadas hacia la cara abaxial, se observa la presencia de las células del floema, como células pequeñas y de pobre tinción (Figura 18 C, flecha C). Este tipo de organización es el típico de las hojas de plantas dicotiledóneas (Golshan et al., 2021).

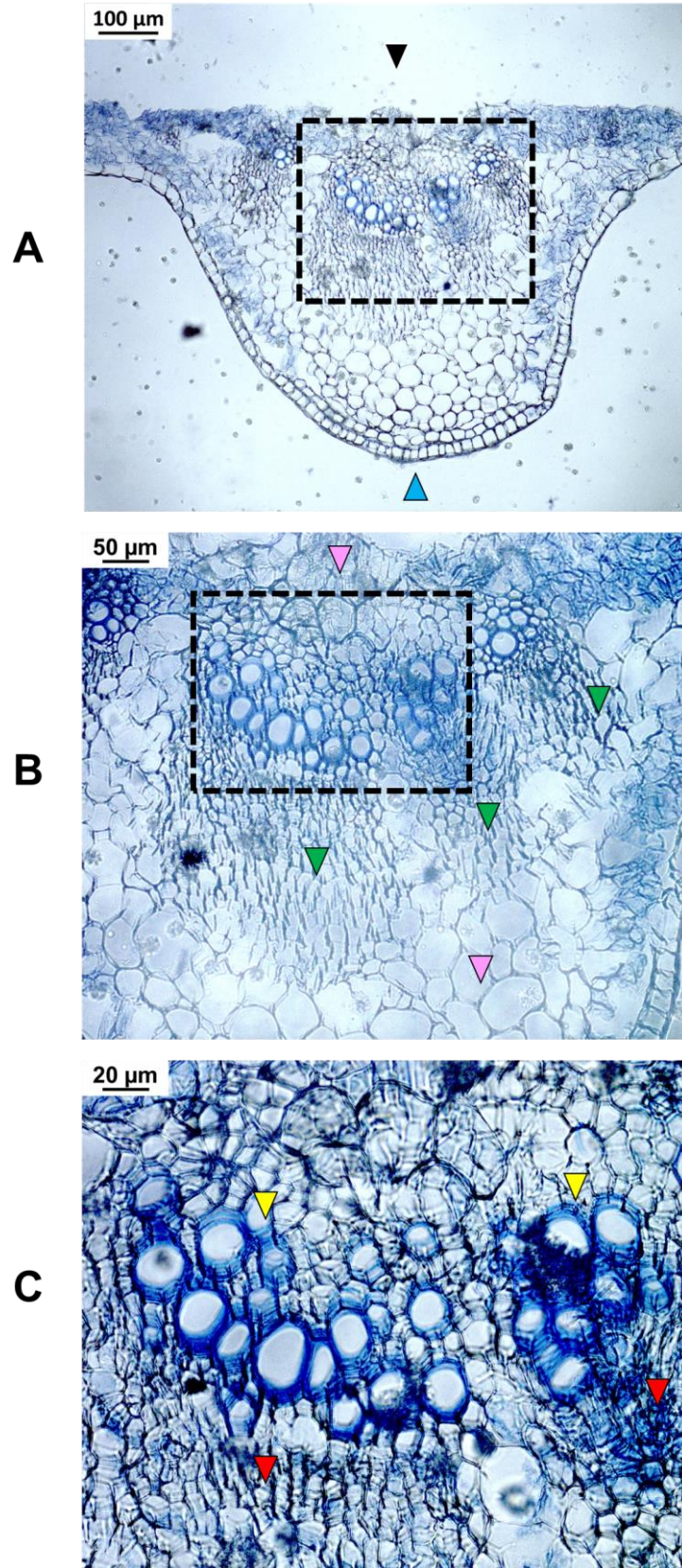


Figura 18. Tinción histoquímica con azul de toluidina de una sección transversal de hoja de *A. mexicana*. A) Sección completa de la zona media apical de una hoja. Se observa la zona adaxial (flecha negra) y la zona abaxial (flecha roja) de la nervadura central. B) Amplificación de la zona señalada en el recuadro en A, señalando las células del colénquima (parénquima esponjoso) (flecha rosada) y a las células fibrosas del esclerénquima (flecha verde). C) Amplificación de la zona señalada en el recuadro de B, así como los vasos del xilema y células del floema (flechas rojas y amarillas, respectivamente. mostrando las células del floema y xilema (flechas roja y amarilla, respectivamente).

3.2 Detección *In situ* de alcaloides en tejidos de *A. mexicana*.

Una vez reconocidos los diferentes tipos celulares y su distribución en los tejidos de *A. mexicana*, se procedió a detectar la posible presencia de alcaloides en ellos. Para esto, se emplearon dos estrategias basadas en las propiedades químicas de estos compuestos. Por un lado, la capacidad de emitir fluorescencia al ser expuestos a irradiación de determinadas longitudes de onda, así como su reactividad con metales pesados en un medio ácido (Brechú-Franco, 2016). Para esto, cortes frescos de los diferentes tejidos fueron expuestos a luz UV de 365 nm (figura 19) o bien, teñidos con el reactivo de Dragendorff (Figura 22).

3.2.1 Detección *In situ* de alcaloides por fluorescencia. Muchos metabolitos secundarios despliegan propiedades fluorescentes que permiten su detección, bajo ciertas condiciones. Los alcaloides bencilisoquinólicos se distinguen por sus propiedades de autofluorescencia que permiten diferenciar las protoberberinas (como la berberina) y las benzofenantridinas (como la sanguinarina) por sus emisiones azul-verdosa y naranja-rojizo, respectivamente, cuando se exponen a radiación λ_{365} . Dado que las características de la emisión se mantienen en los cortes histológicos frescos, es posible identificar las zonas de los tejidos en que ocurren algunos de estos alcaloides (Samamani et al., 2005).

Para ello, criosecciones transversales de tallo, raíz y hoja de 40 μm , tomadas de las mismas regiones que las empleadas para los análisis histoquímicos, fueron observadas por microscopía confocal (Figura 19) con una energía de excitación de 350 nm y con registros de emisión a 405, 480 y 550 nm (Janovská et al., 2009; 2010; Liu et al., 2018; Yang et al., 2004). Se debe señalar que, además de los

alcaloides, en el rango de 405 nm, la fluorescencia detectada coincide con moléculas con núcleos fenólicos, como antocianinas, suberina y flavonoides, mientras que a 480 y 550 nm es común la emisión de algunos alcaloides y de clorofila, respectivamente (Urbanová et al., 2009).

En los cortes de tallo (Figura 19, columna A), colectando las emisiones en los rangos de 405 y 480 nm, se detectaron emisiones azul y verde respectivamente, en las zonas asociadas a los vasos del xilema y poca presencia en la epidermis, pero no en las células parenquimatosas de la médula. En contraste, a 550 nm, se observó una fluorescencia roja en toda la superficie del tejido. Esto difiere de los sitios en que se ha encontrado en *P. somniferum* (Papaveraceae) donde células laticíferas del floema (Ziegler y Facchini, 2008) son las encargadas de la acumulación de los ABIs. En otros grupos de alcaloides, como los indol terpenoides, los sitios de acumulación del alcaloide gelsemina en tallos de *Gelsemium elegans* se identificaron en las células del floema, mediante imágenes generadas por espectrometría de masas (Wu et al., 2022). En tallos de *C. roseus*, los alcaloides vincristina y vinblastina se localizaron en el floema, específicamente en los idioblastos y en las células laticíferas (Yamamoto et al., 2016).

Por su parte, en los cortes de raíz (Figura 19, columna B) se observó una marcada fluorescencia de color azul y verde en longitudes de onda de 405 y 480 nm, respectivamente, en la rizodermis, así como en los haces vasculares, tanto en el xilema como en el floema, pero no en la zona del cambium vascular, intercalada entre ambos tipos de tejido conductor. Cuando las mismas secciones se observaron a 505 nm, las señales de fluorescencia de color rojo no fueron detectadas. Las zonas de acumulación de alcaloides en raíz de *A. mexicana* coinciden con los sitios de acumulación de ABIs en raíces maduras de *T. flavum* donde mediante microscopía de fluorescencia, los alcaloides fueron hallados en la médula del tejido (Samanani et al., 2005). También en *Macleaya cordata* coincidieron las señales de fluorescencias y de las tinciones con Dragendorff en la médula de la raíz (Cheng et al., 2015). Sin embargo, hay discrepancias en los sitios de acumulación de la berberina, respecto a lo encontrado en *Coptis*

japonica, en la que este alcaloide se acumula en toda el área del tejido del rizoma, abarcando la medula y las células de la corteza (He et al., 2018).

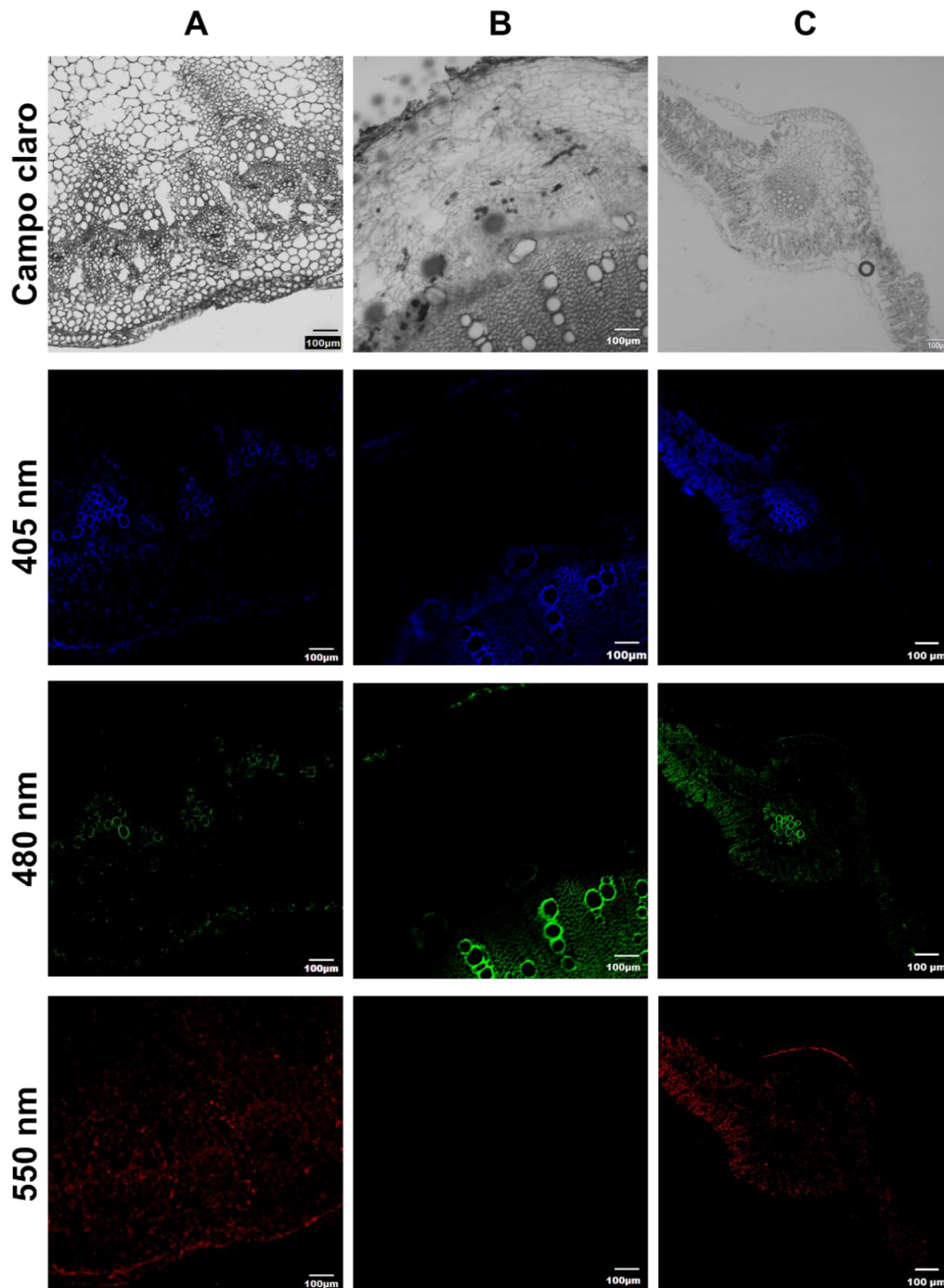


Figura 19. Detección de autofluorescencia en tejidos de *A. mexicana* por microscopía confocal. Para este análisis se emplearon criosecciones transversales (40 μm) de tallo, raíz y hoja (columnas A, B y C, respectivamente). Las criosecciones fueron analizadas con una energía de excitación de 350 nm y de emisión a 405, 480 y 550 nm.

Finalmente, en cortes de hoja, las señales de fluorescencia se encontraron en el parénquima de empalizada de las venas laterales, cuando se emplearon longitudes de onda 405 (azul) y 480 nm (roja), pero no en la epidermis. En la zona de la nervadura central, las señales de fluorescencia se encontraron asociadas con células colenquimatosas reconocidas por su aspecto voluminoso y en el conducto vascular, abarcando tanto las células del xilema como del floema (Figura 19 columna c). Cuando las mismas secciones se observaron a 505 nm, las señales de fluorescencia de color rojo se detectaron en la epidermis, parénquima y colénquima de la nervadura central, pero no en las estructuras vasculares. En las venas laterales la fluorescencia roja se halló en el parénquima de empalizada. En especies como *Prosopis ruscifolia*, los sitios de acumulación de alcaloides fueron localizados en el parénquima de empalizada y en las células del floema de los haces vasculares de (Gomez et al., 2019). La mayoría de los alcaloides indol terpenoides se localizaron en las células idioblásticas y las células laticíferas de las hojas de *C. roseus* (Yamamoto et al., 2019).

Conjuntando las observaciones en los tres tejidos analizados, tanto a 405 y 480 nm, las señales de fluorescencia se hallaron principalmente en la zona de los haces vasculares para todos los tejidos analizados, esto sugiere que los alcaloides se encuentran asociados a los tejidos vasculares. Adicionalmente las señales detectadas en las células de la rizodermis de raíces, sugieren que éstas funcionan como posibles sitios de acumulación. Esto contrasta con lo observado en las hojas en las que, además de los tejidos vasculares, las células del mesófilo, pero no la epidermis, desplegaron señales, sugiriendo esta distribución de los alcaloides (Figura 19). Es importante comentar que los alcaloides protonados pueden ser retenidos en compartimentos ácidos, como vacuolas o espacios del xilema (Nowak y Selmar, 2016). También se describe el tráfico de alcaloides desde el floema hacia el xilema mediante transportadores que ya se han reportado en *C. japonica* (Shitan et al., 2013) y en *A. mexicana* (Loza-Muller et al., 2021 B). Esto permitiría que, después de un evento de transporte, los alcaloides permanezcan en los sitios en que se encuentran.

Además de los alcaloides, otros fitoquímicos pueden emitir señales de fluorescencia bajo luz ultravioleta cuando se observan por microscopía confocal (Figura 19). Estos compuestos incluyen, por ejemplo, flavinas (500-520 nm), antocianinas (360–530 nm), flavonoides (490-590 nm), carotenoides (400-500 nm), lignina 465-700 nm (García-Plazaola et al., 2015; Donaldson, 2020). Con el fin de confirmar que las señales detectadas en los cortes histológicos correspondían a los ABIs, los cortes se observaron después de lavados con metanol. Para ello, criosecciones de 40 μm fueron incubadas con una solución de metanol a temperatura ambiente, durante toda la noche. Las secciones fueron después observadas con un microscopio estereoscópico mientras se irradiaban con luz UV de 356 nm (Figura 20). Antes de los lavados (Figura 20, columnas I y II), los cortes de tallo y hoja desplegaron señales de autofluorescencia verde azulada asociada a los haces vasculares (Figura 20, hilera A y C). Por su parte, en las secciones de raíces, la emisión fluorescente se observó en toda la zona de la médula y en las partes internas de la corteza (Figura 20, hilera B). No obstante, después de los lavados (Figura 20, columna III y IV), estas fluorescencias se perdieron en todos los casos, sugiriendo que podrían corresponder a los alcaloides presentes en los tejidos, ya que estas moléculas pueden ser diluidas en soluciones alcohólicas (Loza-Muller et al., 2021 A).

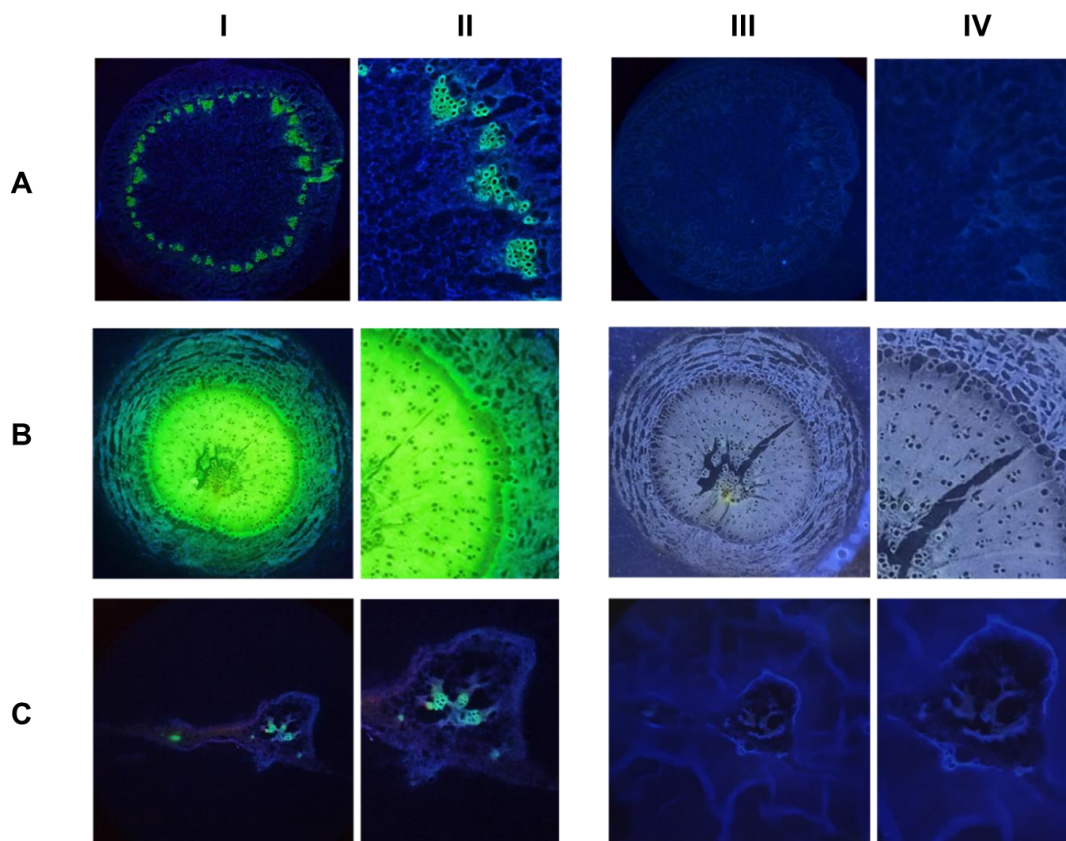


Figura 20. Análisis de las fluorescencias en criosecciones de tallo, raíz y hoja, lavadas con metanol. Antes del lavado con metanol (columna I y II), los cortes de tallo y hoja mostraron autofluorescencia verde azulada asociada a los haces vasculares (hilera A y C). Por su parte, en las secciones de raíces, la emisión fluorescente se observó en toda la zona de la médula y en las partes internas de la corteza (hilera B). Después de los lavados (columna III y IV), estas fluorescencias se perdieron en todos los casos. Las figuras de las columnas II y IV, es un acercamiento de la zona mostrada en las figuras de las columnas I y III respectivamente.

Se debe mencionar que las características de emisión fluorescentes fueron comparadas contra los estándares comerciales de sanguinarina y berberina aplicados directamente sobre papel de nitrocelulosa, así como contra la impresión de tejidos sobre la misma matriz (Figura 21). Para esto, se seleccionaron tallos (Figura 21, hilera A) y semillas maduras (Figura 21, hilera B), como indicadores de tejidos acumuladores de berberina y sanguinarina, respectivamente. Las impresiones se obtuvieron como se describe en la sección 2.2.3 y fueron después expuestas a radiación UV de 356 nm (Figura 21, columna II), observándose emisiones de fluorescencia verde azulada y amarillo naranja, provenientes del tallo

y semilla respectivamente, lo que coincidió con las emisiones de los estándares correspondientes (Figura 21, E y F). En conjunto, estas observaciones sugieren que las señales de auto fluorescencia detectadas en los tejidos analizados corresponden a los alcaloides de interés (Figura 19) ya que éstas fueron similares a los estándares comerciales y resultaron solubles en las soluciones alcohólicas (Figura 20).

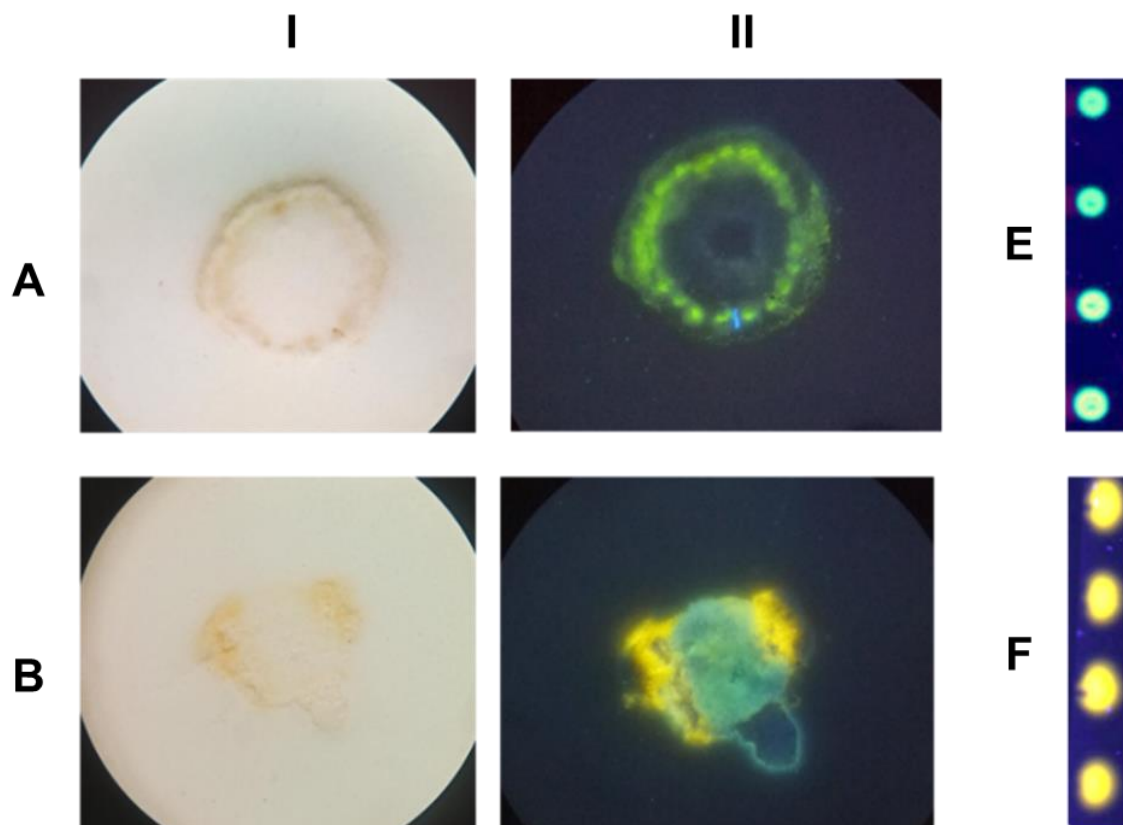


Figura 21. Impresiones de tejido en tallo (fila A) y semilla madura (fila B). Las impresiones se documentaron bajo campo claro (columna I) y bajo luz UV de 356 nm (columna II). Se observa que la fluorescencia proveniente del tallo coincide con el color del estándar de berberina (E) y mientras que la proveniente de la semilla madura (principalmente de la testa) coincide al estándar de la sanguinarina (F).

3.2.2 Tinción *In situ* de los alcaloides de *A. mexicana* con el reactivo de Dragendorff. El reactivo Dragendorff se une a compuestos con nitrógeno terciario, como los alcaloides, formando un precipitado naranja-café que denota la presencia de tales compuestos, tanto en soluciones, como en la superficie de matrices sólidas que los contengan (Brechú-Franco et al., 2016). Con el fin de corroborar que fluorescencia emitida por los cortes histológicos era causada por los alcaloides presentes en esos tejidos, se analizaron criosecciones de 30 μm de tallo, hoja y raíz después de ser expuestas a esta preparación (Figura 22, panel superior). Como testigos negativos, se emplearon tejidos de *Ruellia tuberosa* (Acanthaceae), conocida en México como hierba del toro y de la que no se tienen reportes como productora de alcaloides (Figura 22, panel inferior) (Safitri et al., 2020). En las raíces de *A. mexicana*, se observaron acumulaciones de precipitado marrón en la rizodermis, así como en las células del xilema (Figura 22, hilera A) mientras que en los tallos las zonas de reacción se concentraron principalmente en las células del xilema (Figura 22, hilera B). En las hojas, las zonas de reacción se concentraron en el parénquima de empalizada de las venas laterales; y en la nervadura central, la tinción se localizó en el colénquima y los haces vasculares (Figura 22, hilera C). En contraste, en los cortes de *R. tuberosa* no se logró detectar la formación del precipitado, después del tratamiento con el reactivo (Figura 22, panel inferior).

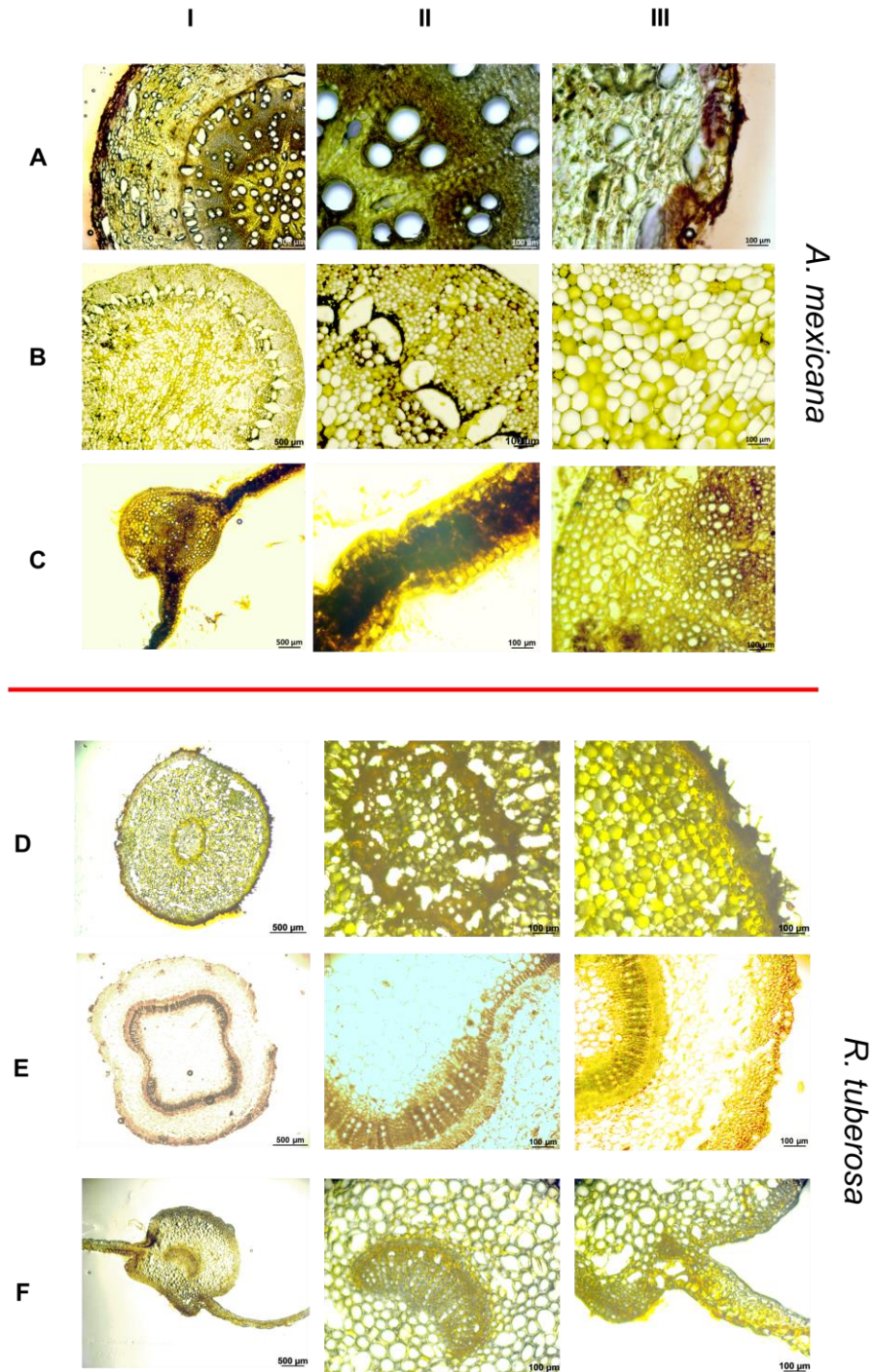


Figura 22. Detección de alcaloides en tejidos de *A. mexicana* (panel superior) y *R. tuberosa* (panel inferior), por tinción con el reactivo de Dragendorff. La coloración marrón indica reacción positiva a la presencia de alcaloides. Los tejidos analizados fueron raíz (hilera A y D), tallo (hilera B y E), y hoja (hilera C y F). La columna I corresponde a las secciones observadas a 2.5X. Las columnas II y III corresponden a una ampliación de las figuras de la columna I, observadas a 10X.

En conjunto, los resultados mostrados en las secciones previas sugieren que las zonas de reacción del Dragendorff (Figura 22) coincide con las zonas de fluorescencia (Figura 19). De este modo, en conjunto estos datos sugieren que los alcaloides se alojan en los haces vasculares de los tejidos analizados, específicamente en las células del xilema. Por ello, cuando las secciones son lavadas con soluciones alcohólicas, estos metabolitos son diluidos y la fluorescencia ya no es detectada. Estos criterios apuntan que los alcaloides en *A. mexicana* se acumulan en las células del xilema de tallo, raíz y hoja, así como en la rizodermis y en las células del mesófilo, en concreto de parénquima de empalizada asociado a las nervaduras laterales de las hojas.

3.3 Detección *In situ* de los transcritos involucrados en la biosíntesis de alcaloides en tejidos de *A. mexicana*.

Tal como se ha descrito en algunas plantas productoras de alcaloides, existe un grupo de células encargadas en la acumulación de alcaloides y otro grupo encargadas en la transcripción de los genes biosintéticos (Ziegler y Facchini, 2008). En *A. mexicana* se desconocen los sitios biosintéticos. Por ello se emplearon criosecciones transversales de 30 μm de grosor y mediante *In situ* RT-PCR se analizó la expresión de los genes *Am-NCS1*, *Am-BBE1*, como marcadores de las reacciones del tramo común de la ruta de biosíntesis (Figura 5); *Am-StySyn* específico para sanguinarina (Figura 6) y *Am-SOMT* como específico de berberina (Figura 7). Se incluyó el análisis el gen ribosomal 18S, como control positivo y la digestión del DNA genómico, como control negativo.

En secciones de tallo (Figura 23) la detección de los transcritos (observada como una señal púrpura) de los genes *Am-NCS*, *Am-SOMT* y *Am-StySyn* se hallaron en la zona de las células del cambium intravascular y en las células de la epidermis. A excepción del transcrito del gen *Am-BBE1* cuya expresión se concentró sobre la epidermis (Figura 23). En secciones de raíz (Figura 24), los sitios de expresión de los genes involucrados en el tramo común y de los específicos se localizaron sobre las células de la corteza y pequeñas señales en las células del periciclo (Figura 24).

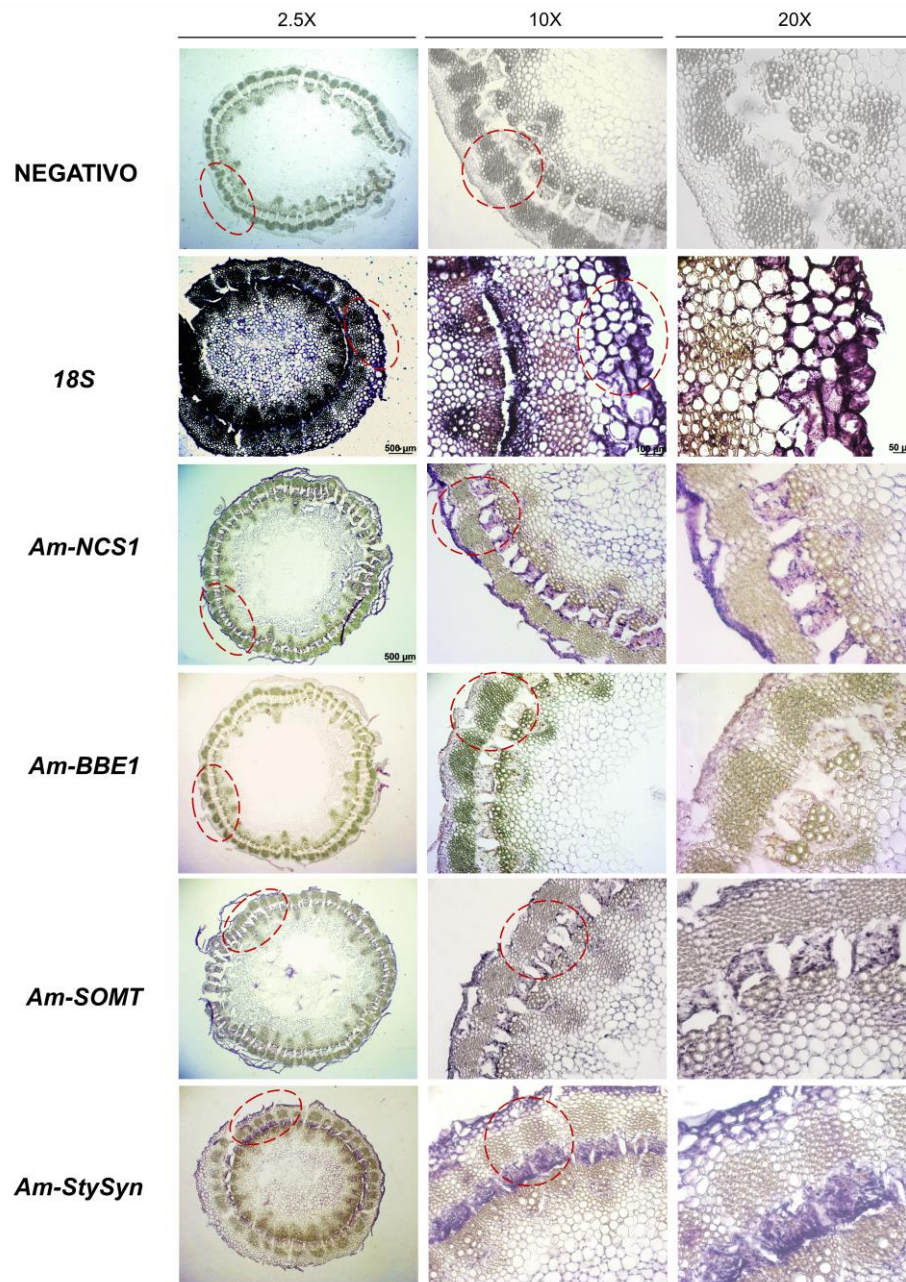


Figura 23. Análisis de expresión de los genes ABIs en criosecciones de tallo. Mediante *In situ* RT-PCR. Se analizó la expresión de los genes del tramo común (*Am-NCS1* y *Am-BBE1*) y los específicos de sanguinarina (*Am-StySyn*) y berberina (*Am-SOMT*). Los sitios de expresión (púrpura) se identificaron en la zona del floema. Se empleó al gen ribosomal *18S* como control positivo y la digestión del DNA como control negativo. Las imágenes de la columna 10X son ampliaciones de las zonas señaladas en la elipse roja en la columna 2.5 x. Las imágenes de la columna 20X son ampliaciones de las zonas señaladas en la elipse roja en la columna 10X.

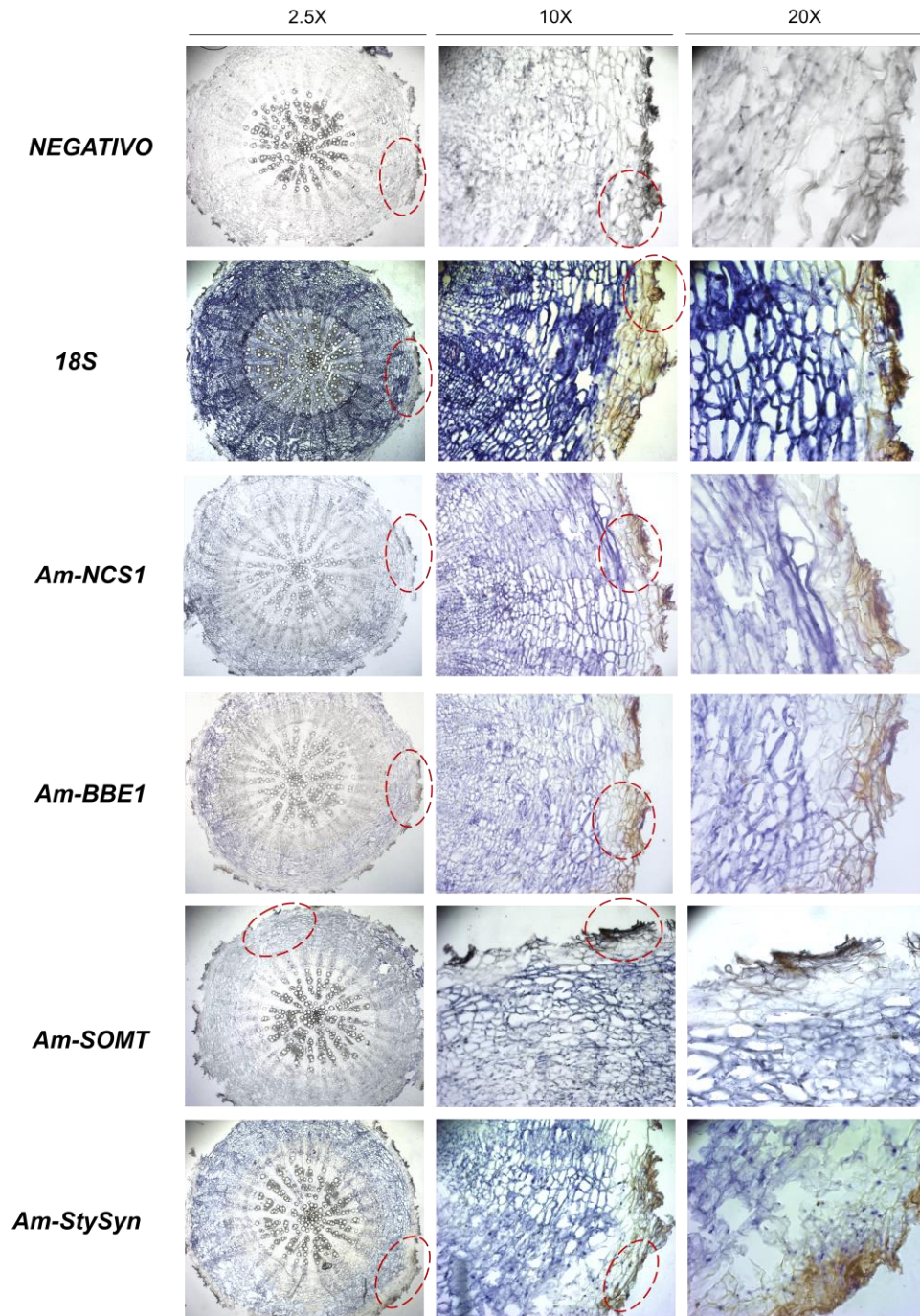


Figura 24. Análisis de expresión de los genes ABIs en criosecciones de raíz. Mediante *In situ* RT-PCR. Se analizó la expresión de los genes del tramo común (*Am-NCS1* y *Am-BBE1*) y los específicos de sanguinarina (*Am-StySyn*) y berberina (*Am-SOMT*). Los sitios de expresión (púrpura) se identificaron las células de la corteza. Se empleó al gen ribosomal *18S* como control positivo y la digestión del DNA como control negativo. Las imágenes de la columna 10X son ampliaciones de las zonas señaladas en la elipse roja en la columna 2.5 x. Las imágenes de la columna 20X son ampliaciones de las zonas señaladas en la elipse roja en la columna 10X.

Los sitios de expresión detectados en *A. mexicana* comparten similitudes en comparación con lo sitios de expresión en *P. somniferum* donde los transcritos de los genes biosintéticos de la morfina se detectaron en las células acompañantes del floema. Sin embargo, en la raíz de la adormidera, los genes se han detectado en el floema cercano al peridermis (Facchini y De Luca, 1995; Bird et al., 2023) difiriendo con *A. mexicana* donde los transcritos fueron detectados en las células de la corteza y el periciclo. En *T. flavum* el análisis de los transcritos, los involucrados en la ruta común y los específicos para berberina, estos fueron localizados en la zona de la medula de la raíz específicamente en la endodermis inmadura (Figura 11B) (Samanani et al., 2005). Es interesante notar que en tallo los transcritos se distribuyeron en dos tipos celulares, el cambium intravascular y la epidermis, difiriendo con la distribución de los alcaloides (Figura 19 y 22). En raíces, la corteza y el periciclo mostraron la presencia de los transcritos, mientras que el xilema y la rizodermis acumulan a los alcaloides: (Figura 19 y 22).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

El objetivo principal de este trabajo fue reconocer la organización celular y los sitios específicos en la síntesis y en la acumulación de los alcaloides en tejidos de *A. mexicana*. Para este fin, fue necesario primero identificar los tipos celulares mediante tinción histoquímica con azul de toluidina en secciones histológicas. La organización celular hallada en los tejidos de *A. mexicana* fue típica de plantas dicotiledóneas (Mitra y Loqué, 2014) en lo que las raíces se organizan en capas concéntricas con los haces vasculares en la zona de la médula y rodeados por la corteza (Figura 17). Por su parte, en el tallo, los haces vasculares se disponen en forma periférica con los conductos del xilema y floema localizados en la parte interna y externa, respectivamente y paquetes de células de cambium entre ambos (Figura 18).

Una vez identificados los componentes celulares de los tejidos, se realizó el análisis *In situ* de los sitios de acumulación de los alcaloides mediante microscopía de fluorescencia. En tallo las señales fluorescentes correspondiente a los alcaloides (480 nm) se hallaron en la zona del xilema (Figura 19), estos difieren de los sitios de acumulación de especies como *P. somniferum* y *C. roseus* donde los sitios de acumulación han sido hallados en las células del floema. En las raíces, las señales de fluorescencias se identificaron en la zona del xilema, así como en las células de la rizodermis, coincidiendo con la acumulación en la medula de las raíces maduras de *T. flavum* (Samanani et al., 2005) y de las raíces de *M. cordata* (Cheng et al., 2015). Sin embargo, en estas especies los alcaloides no se acumulan en la rizodermis, tal como sucede en *A. mexicana*. Por su parte, en hojas las señales de fluorescencia se hallaron en el parénquima de empalizada de las venas laterales, pero no en la epidermis. En la zona de la nervadura central de la hoja, las señales de fluorescencia se encontraron asociadas con las células colenquimatosas y en el cilindro vascular, abarcando a las células del xilema (Figura 19). Estos sitios coinciden con lo observado en *P. ruscifolia*, donde los

sitios de acumulación de alcaloides fueron localizados en el parénquima de empalizada (Gomez et al., 2019).

La idea de que los sitios y las señales de fluorescencias podrían corresponder a los alcaloides de la planta se reforzó mediante el lavado de estos tejidos con metanol (Figura 20), provocando la pérdida de las señales de fluorescencia, posiblemente al solubilizarse los compuestos polares, como los alcaloides. Además, al hacer las impresiones de superficie de tallo y semilla madura, tejidos referentes en la acumulación de berberina y sanguinarina respectivamente (Figura 21), la señal de fluorescencia hallada en los tejidos coincidió con la de los estándares comerciales de sanguinarina (amarillo-naranja) y berberina (verde-azul). Un criterio más que refuerza el sitio de los alcaloides en tejidos de *A. mexicana*, fue el análisis mediante la tinción con Dragendorff (Figura 22), donde las zonas de reacción (marrón) coincidieron en las mismas zonas de las señales fluorescentes de los tejidos (Figura 19). Los resultados en los análisis de los transcritos por *In situ* RT-PCR, muestran que en tallo los sitios de expresión se localizan en la epidermis y en la zona del cambium intravascular (Figura 23) mientras que en la raíz los sitios de expresión se localizan en la zona de la corteza y las células del periciclo (Figura 24).

La tabla 3, resume los resultados referentes a la localización de alcaloides y transcritos biosintéticos en los tejidos analizados. En breve, los datos muestran que, en las secciones de raíces, los sitios de acumulación de alcaloides se encontraron en la rizodermis y en células del cilindro vascular (xilema), aunque los transcritos se encontraron principalmente en la corteza y periciclo. Por su parte, en el tallo las señales de fluorescencia, atribuida a la presencia de alcaloides, en los haces vasculares (xilema), mientras que los transcritos se detectaron en las células del cambium intravascular y la epidermis. Estos datos demuestran una discrepancia entre los sitios de acumulación y los sitios de expresión en los tejidos de *A. mexicana*, y que esta planta podría requerir el transporte de intermediarios entre las células de un mismo tejido y asociarse con el transporte a larga distancia.

Tabla 3. Resumen de la localización de los alcaloides y de transcritos biosintéticos analizados en tejidos de *A. mexicana*. ¹⁾Se refiere a la detección de señales de transcritos para *NCS* y *BBE*; ²⁾ para *SOMT*; ³⁾ para *StySyn*; y ⁴⁾ señal positiva para emisión de fluorescencia y reacción positiva a Dragendroff: ++ Detectado. ND: No detectado.

| Tejido | Localización | Genes | | | Alcaloides ⁴ |
|--------|------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | Tramo común ¹ | Berberina ² | Sanguinaria ³ | |
| Raíz | Rizodermis | ND | ND | ND | ++ |
| | Corteza | ++ | ++ | ++ | ND |
| | Periciclo | ++ | ++ | ++ | ND |
| | Médula | ND | ND | ND | ++ |
| Tallo | Epidermis | ++ | ++ | ++ | ND |
| | Colenquima | ND | ND | ND | ND |
| | Parénquima | ND | ND | ND | ND |
| | Haces vasculares | ++ | ++ | ++ | ++ |

Agrupando estos datos, la figura 25 presenta una propuesta para la integración de estos resultados, mostrando los sitios de acumulación y de expresión en tejidos de *A. mexicana*. En tallo, los alcaloides se acumulan sólo en el xilema, sin embargo, los sitios de expresión se localizan en la epidermis y en la zona del floema (Figura 25 A). En raíz, los alcaloides se acumulan en la rizodermis y en el xilema, mientras que los sitios de expresión se localizan en la zona de la corteza y las células del periciclo (Figura 25 B). En hoja, los alcaloides fueron detectados en el parénquima de empalizada y en el colénquima (Figura 25 C).

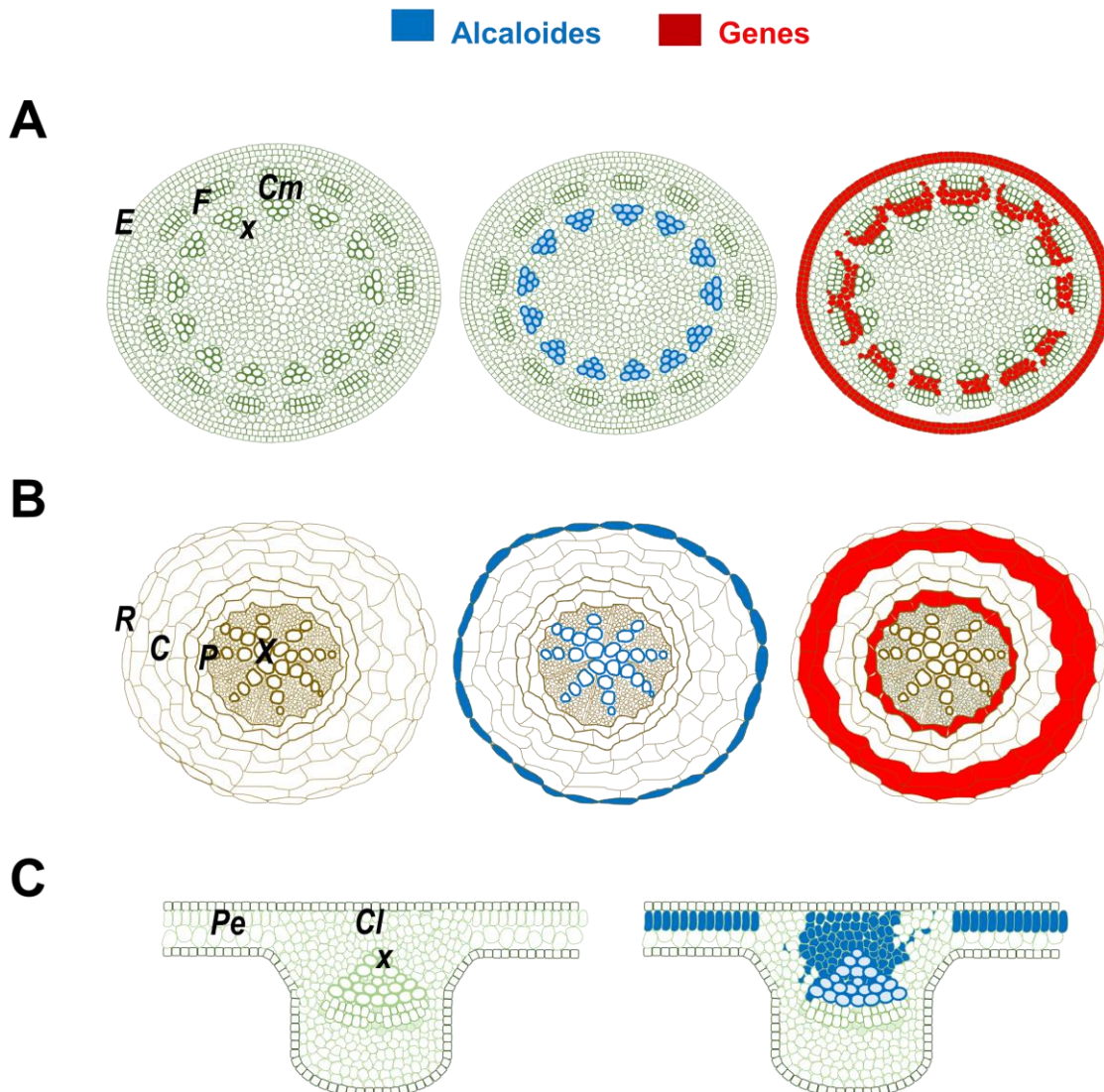


Figura 25. Sitios de acumulación de alcaloides y de expresión de los genes ABIs en tejidos de *A. mexicana*. Los sitios de acumulación de alcaloides están representados en color azul y los sitios de expresión de los genes biosintéticos de ABIs están representados en rojo en tejidos tallo (A), raíz (B) y hoja (C). E: epidermis, F: floema, X: xilema, Cm: cambium, R: rizodermis, C: corteza, P: periciclo, Pe: parénquima de empalizada, Cl: colénquima.

CAPITULO V

PERSPECTIVAS

Con estos resultados se amplía el conocimiento sobre las particularidades en la síntesis, acumulación y de tráfico de los alcaloides en relación con las funciones biológicas de las células involucradas en un interesante modelo como lo es *A. mexicana*. Hasta el momento se analizaron los sitios de acumulación en hojas, tallo y raíz. Sin embargo, restan tejidos interesantes como semillas y frutos que modulan el contenido de los alcaloides durante su desarrollo. Además, esto abre perspectivas para continuar estos estudios, ampliando los transcritos estudiados para incluir la ruta completa. Adicionalmente, se podrían obtener anticuerpos con la finalidad analizar de manera *In situ* los sitios donde se alojan las enzimas biosintéticas. Con esta investigación, se puede dar evidencia de las discrepancias entre los sitios de expresión y de acumulación de alcaloides, y se podrían incluir en los análisis en la expresión de otros genes de interés como los transportadores de alcaloides. Al ya tener el conocimiento de los sitios celulares específicos, se pretende, ahora con las tecnologías de análisis de una célula como la microdissección laser, realizar transcriptomas, ensayos de proteómica y metabolómica. En este proyecto también se desarrolló una novedosa metodología de *In situ* RT-PCR basado en cápsulas de tubos de centrifuga, lo cual se pretende ampliar su aplicación ahora en tejidos de animales.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcantara, J., Bird, D. A., Franceschi, V. R., & Facchini, P. J. (2005). Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant Physiology*, 138(1), 173-183. <https://doi.org/10.1104/pp.105.059287>
- Amin AH, Subbaiah TV, Abbasi KM. Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Can J Microbiol* 1969; 15(9): 1067–1076. <https://doi.org/10.1139/m69-190>
- Anke, S., Niemüller, D., Moll, S., Hänsch, R., & Ober, D. (2004). Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. *Plant Physiology*, 136(4), 4037-4047. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052357>
- Archambault, J., Williams, R. D., Bédard, C., & Chavarie, C. (1996). Production of sanguinarine by elicited plant cell culture I. Shake flask suspension cultures. *Journal of Biotechnology*, 46(2), 95-105. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00184-0](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00184-0)
- Athman, A., Tanz, S. K., Conn, V. M., Jordans, C., Mayo, G. M., Ng, W. W., ... & Gilliam, M. (2014). Protocol: a fast and simple in situ PCR method for localising gene expression in plant tissue. *Plant Methods*, 10, 1-20. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-29>
- Bae, E. A., Han, M. J., Kim, N. J., & Kim, D. H. (1998). Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(9), 990-992. <https://doi.org/10.1248/bpb.21.990>
- Beaudoin, G. A., & Facchini, P. J. (2013). Isolation and characterization of a cDNA encoding (S)-cis-N-methylstylopine 14-hydroxylase from opium poppy, a key enzyme in sanguinarine biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(3), 597-603. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.129>
- Beaudoin, G. A., y Facchini, P. J. (2014). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*, 240(1), 19-32. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2056-8>
- Beuria, T. K., Santra, M. K., & Panda, D. (2005). Sanguinarine blocks cytokinesis in bacteria by inhibiting FtsZ assembly and bundling. *Biochemistry*, 44(50), 16584-16593. <https://doi.org/10.1021/bi050767+>
- Bird, D. A., Franceschi, V. R., & Facchini, P. J. (2003). A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *The Plant Cell*, 15(11), 2626-2635. <https://doi.org/10.1105/tpc.015396>
- Blanchfield, J. T., Sands, D. P., Kennard, C. H., Byriel, K. A., & Kitching, W. (2003). Characterisation of alkaloids from some Australian *Stephania* (Menispermaceae) species. *Phytochemistry*, 63(6), 711-720. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00240-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00240-1)
- Bosch, C. H. *Argemone mexicana* L. Record from Protabase. Schmelzer, G. H; Gurib-Fakim, A. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa), Wageningen, Netherlands. <http://database.prota.org/search.htm>. (2007).

-
- Brahmachari, G.; Gorai, D.; Roy, R (2013). *Argemone mexicana*: Chemical and pharmacological aspects. *Rev Bras Farmacogn*, 3: 559-575 <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000021>
 - Brechú-Franco, A. E., Laguna-Hernández, G., De la Cruz-Chacón, I., & González-Esquinca, A. R. (2016). *In situ* histochemical localisation of alkaloids and acetogenins in the endosperm and embryonic axis of *Annona macrophyllata* Donn. Sm. seeds during germination. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 60(1), 55-58. <https://doi.org/10.4081/ejh.2016.2568>
 - Burlat, V., Oudin, A., Courtois, M., Rideau, M., & St-Pierre, B. (2004). Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *The Plant Journal*, 38(1), 131-141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02030.x>
 - Chávez, M. L. D., Rolf, M., Gesell, A., & Kutchan, T. M. (2011). Characterization of two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P450-dependent enzymes of alkaloid formation in the Mexican prickly poppy *Argemone mexicana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 507(1), 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.11.016>
 - Chen, Z. L., & Zhu, D. Y. (1987). Aristolochia alkaloids. In *The alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (Vol. 31, pp. 29-65). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0099-9598\(08\)60257-6](https://doi.org/10.1016/S0099-9598(08)60257-6)
 - Cheng, Q., Le, J., & Zeng, J. (2015). Morphology and Developmental Anatomy of Medicinal Plant *Macleaya cordata*. *Chinese Bulletin of Botany*, 50(1), 72-82. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1259.2015.00072>
 - Cometa, S., Bonifacio, M. A., Licini, C., Bellissimo, A., Pinto, L., Baruzzi, F., ... & De Giglio, E. (2021). Innovative eco-friendly hydrogel film for berberine delivery in skin applications. *Molecules*, 26(16), 4901. <https://doi.org/10.3390/molecules26164901>
 - De-La-Cruz Chacón, I., González-Esquinca, A. R., & Riley-Saldaña, C. A. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas scientiarum*, 17(2), 189-202. Consultado el 30 de noviembre de 2023 en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832012000200006&lng=en&nrm=iso&tling=es
 - Donaldson, L. (2020). Autofluorescence in plants. *Molecules*, 25(10), 2393. <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>
 - Dong, Z., Liu, M., Zhong, X., Ou, X., Yun, X., Wang, M., ... y Zeng, J. (2021). Identification of the impurities in Bopu Powder® and Sangrovit® by LC-MS combined with a screening method. *Molecules*, 26(13), 3851. <https://doi.org/10.3390/molecules26133851>
 - Facchini, P. J., & De Luca, V. (1994). Differential and tissue-specific expression of a gene family for tyrosine/dopa decarboxylase in Opium poppy. *Journal of Biological Chemistry*, 269(43), 26684-26690. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47073-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47073-1)
-

-
- Facchini, P. J., & De Luca, V. (1995). Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in Opium poppy. *The Plant Cell*, 7(11), 1811-1821. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.11.1811>
 - Facchini, P. J., & St-Pierre, B. (2005). Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(6), 657-666. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.09.008>
 - Facchini, P. J., Penzes, C., Johnson, A. G., & Bull, D. (1996). Molecular characterization of berberine bridge enzyme genes from opium poppy. *Plant Physiology*, 112(4), 1669-1677.
 - Facchini, P.J., (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 29-66. <https://doi.org/10.1104/pp.112.4.1669>
 - Fan, X. X., Leung, E. L. H., Xie, Y., Liu, Z. Q., Zheng, Y. F., Yao, X. J., ... & Liu, L. (2018). Suppression of lipogenesis via reactive oxygen species–AMPK signaling for treating malignant and proliferative diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 28(5), 339-357. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7090>
 - Frenzel, T., y Zenk, M. H. (1990). S-Adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine- 4'-O-methyl transferase, a regio-and stereoselective enzyme of the (S)-reticuline pathway. *Phytochemistry*, 29(11), 3505-3511. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85265-H](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85265-H)
 - García-Plazaola, J. I., Fernández-Marín, B., Duke, S. O., Hernández, A., López-Arbeloa, F., & Becerril, J. M. (2015). Autofluorescence: biological functions and technical applications. *Plant Science*, 236, 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.010>
 - Gesell, A., Díaz Chávez, M. L., Kramell, R., Piotrowski, M., Macheroux, P., & Kutchan, T. M. (2011). Heterologous expression of two FAD-dependent oxidases with (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase activity from *Argemone mexicana* and *Berberis wilsoniae* in insect cells. *Planta*, 233, 1185-1197. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1357-4>
 - Golshan, Z., Diker, N. Y., Arituluk, Z. C., & Cankaya, I. I. T. (2021). *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae) morphology, anatomy and traditional medicinal uses in Turkey. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 51(1), 123-132. DOI: 10.26650/IstanbulJPharm.2020.0074
 - Gomez, A. A., Mercado, M. I., Belizán, M. M., Ponessa, G., Vattuone, M. A., & Sampietro, D. A. (2019). *In situ* histochemical localization of alkaloids in leaves and pods of *Prosopis ruscifolia*. *Flora*, 256, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.04.008>
 - Guízar-González, C., Trujillo-Villanueva, K., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2012). Sanguinarine and dihydrosanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* (L) Cell suspension cultures exposed to yeast extract. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(1), 19-22. Consultado el 30 de noviembre de 2023 en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-249X2012000100005
-

-
- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 54(5), 647-672. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct020>
 - Hagel, J. M., Beaudoin, G. A., Fossati, E., Ekins, A., Martin, V. J., & Facchini, P. J. (2012). Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42972-42983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420414>
 - Han, N., Yang, Z., Liu, Z., Liu, H., & Yin, J. (2016). Research progress on natural benzophenanthridine alkaloids and their pharmacological functions: A review. *Natural Product communications*, 11(8), 1181-1188. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100>
 - Hauschild, K., Pauli, H. H., & Kutchan, T. M. (1998). Isolation and analysis of a gene bbe1 encoding the berberine bridge enzyme from the California poppy *Eschscholzia californica*. *Plant Molecular Biology*, 36(3), 473-478. <https://doi.org/10.1023/A:1005917808232>
 - He, Y., Yuan, X., Zuo, H., Sun, Y., & Feng, A. (2018). Berberine exerts a protective effect on gut-vascular barrier via the modulation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway during sepsis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(4), 1342-1351. <https://doi.org/10.1159/000493412>
 - Ignatov, A., Clark, W. G., Cline, S. D., Psenak, M., Krueger, R. J., & Coscia, C. J. (1996). Elicitation of dihydrobenzophenanthridine oxidase in *Sanguinaria canadensis* cell cultures. *Phytochemistry*, 43(6), 1141-1144. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00540-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00540-7)
 - Ikezawa, N., Iwasa, K., & Sato, F. (2007). Molecular cloning and characterization of methylenedioxy bridge-forming enzymes involved in stylophine biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *The FEBS Journal*, 274(4), 1019-1035. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05652.x>
 - Ikezawa, N., Iwasa, K., & Sato, F. (2009). CYP719A subfamily of cytochrome P450 oxygenases and isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Eschscholzia californica*. *Plant Cell Reports*, 28, 123-133. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0624-8>
 - Ikezawa, N., Tanaka, M., Nagayoshi, M., Shinkyō, R., Sakaki, T., Inouye, K., & Sato, F. (2003). Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38557-38565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302470200>
 - Janovská, M., Kubala, M., Šimánek, V., & Ulrichová, J. (2009). Fluorescence of sanguinarine: fundamental characteristics and analysis of interconversion between various forms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 235-240. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2903-9>
 - Kokkrua, S., Ismail, S. I., Mazlan, N., & Dethoup, T. (2020). Efficacy of berberine in controlling foliar rice diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 147-158. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01871-3>
-

-
- Kuo, C. L., Chou, C. C., & Yung, B. Y. M. (1995). Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Cancer Letters*, 93(2), 193-200. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)03809-B](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)03809-B)
 - Laines-Hidalgo, J. I., Muñoz-Sánchez, J. A., Loza-Müller, L., & Vázquez-Flota, F. (2022). An update of the sanguinarine and benzophenanthridine alkaloids' biosynthesis and their applications. *Molecules*, 27(4), 1378. <https://doi.org/10.3390/molecules27041378>
 - Laines-Hidalgo, José Ignacio; Vázquez-Flota, Felipe Augusto. (2019). Análisis de la síntesis de alcaloides en fruto y semilla de *Argemone mexicana* L. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
 - Liscombe, D. K., & Facchini, P. J. (2007). Molecular cloning and characterization of tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase, an enzyme involved in alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Journal of Biological Chemistry*, 282(20), 14741-14751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611908200>
 - Liscombe, D. K., MacLeod, B. P., Loukanina, N., Nandi, O. I., & Facchini, P. J. (2005). Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry*, 66(11), 1374-1393. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.029>
 - Liscombe, D. K., y Facchini, P. J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.012>
 - Liscombe, D. K., Ziegler, J., Schmidt, J., Ammer, C., & Facchini, P. J. (2009). Targeted metabolite and transcript profiling for elucidating enzyme function: isolation of novel N-methyltransferases from three benzyloquinoline alkaloid-producing species. *The Plant Journal*, 60(4), 729-743. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03980.x>
 - Liu, H., Wang, J., Zhao, J., Lu, S., Wang, J., Jiang, W., ... & Zhou, L. (2009). Isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* active against plant microbial pathogens. *Natural Product Communications*, 4(11), 1934578X0900401120. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900401120>
 - Liu, Q., Xie, Z., Liu, T., & Fan, J. (2018). Determination of berberine hydrochloride using a fluorimetric method with silica nanoparticles as a probe. *RSC Advances*, 8(11), 6075-6082. <https://doi.org/10.1039/C7RA13048A>
 - Loza-Muller, L. J., Laines-Hidalgo, J. I., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2021). Alkaloid distribution in seeds of *Argemone mexicana* L.(Papaveraceae). *Journal of the Mexican Chemical Society*, 65(4), 501-506. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v65i4.1574>
 - Loza-Muller, L., Shitan, N., Yamada, Y., & Vázquez-Flota, F. (2021). AmABCB1, an alkaloid transporter from seeds of *Argemone mexicana* L (Papaveraceae). *Planta*, 254(6), 122. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03780-4>
 - Lozoya, X. (1999). Un paraíso de plantas medicinales. *Arqueología Mexicana*, 7(39), 14-21.
-

-
- Lozoya, X., y M. Lozoya, (1982) Flora medicinal de México. *Plantas indígenas. Primera parte*. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F; México. IMSS. pp. 148-173.
 - Martínez, M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. *Fondo de Cultura Económica*. México, D.F. 1979.
 - Mitra, P. P., & Loqué, D. (2014). Histochemical staining of *Arabidopsis thaliana* secondary cell wall elements. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (87), e51381. <https://dx.doi.org/10.3791/51381>
 - Moll, S., Anke, S., Kahmann, U., Hänsch, R., Hartmann, T., & Ober, D. (2002). Cell-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *Senecio vernalis*, in comparison with its ancestor, deoxyhyposine synthase. *Plant Physiology*, 130(1), 47-57. <https://doi.org/10.1104/pp.004259>
 - Monforte-González, M., Guízar-González, C., Rubio-Piña, J., Carrillo-Pech, M., & Vázquez-Flota, F. (2012). Berberine and sanguinarine quantitation in *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) tissues by TLC-in situ fluorography. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 25(4), 358-360. <https://doi.org/10.1556/jpc.25.2012.4.14>
 - Ngerensaengsaruy, C., Leksungnoen, N., Chanton, P., Andriyas, T., Thaweekun, P., Rueansri, S., ... & Hauyluek, W. (2023). Morphology, Taxonomy, Anatomy, and Palynology of the Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.) Cultivation in Northern Thailand. *Plants*, 12(11), 2105. <https://doi.org/10.3390/plants12112105>
 - Nowak, M., & Selmar, D. (2016). Cellular distribution of alkaloids and their translocation via phloem and xylem: the importance of compartment pH. *Plant Biology*, 18(6), 879-882. <https://doi.org/10.1111/plb.12504>
 - Okada, N., Koizumi, N., Tanaka, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S., & Yamada, Y. (1989). Isolation, sequence, and bacterial expression of a cDNA for (S)-tetrahydroberberine oxidase from cultured berberine-producing *Coptis japonica* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(2), 534-538. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.2.534>
 - Onoyovwe, A., Hagel, J. M., Chen, X., Khan, M. F., Schriemer, D. C., & Facchini, P. J. (2013). Morphine biosynthesis in opium poppy involves two cell types: sieve elements and laticifers. *The Plant Cell*, 25(10), 4110-4122. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115113>
 - Oudin, A., Mahroug, S., Courdavault, V., Hervouet, N., Zelwer, C., Rodríguez-Concepción, M., ... & Burlat, V. (2007). Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. *Plant Molecular Biology*, 65, 13-30. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9190-7>
 - Ounaron, A., Decker, G., Schmidt, J., Lottspeich, F., & Kutchan, T. M. (2003). (R, S)-Reticuline 7-O-methyltransferase and (R, S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase of *Papaver somniferum*—cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid

- biosynthesis in opium poppy. *The Plant Journal*, 36(6), 808-819. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01928.x>
- Parizot, B., Laplaze, L., Ricaud, L., Boucheron-Dubuisson, E., Bayle, V., Bonke, M., ... & Nussaume, L. (2008). Diarch symmetry of the vascular bundle in *Arabidopsis* root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiology*, 146(1), 140-148. <https://doi.org/10.1104/pp.107.107870>
 - Pauli, H. H., & Kutchan, T. M. (1998). Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S) -N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*, 13(6), 793-801. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00085.x>
 - Pitty, A., & Muñoz, R. (1993). *Guía práctica para el manejo de malezas*. Escuela Agrícola Panamericana, Tegucigalpa (Honduras).
 - Preininger, V. (1975). The pharmacology and toxicology of the papaveraceae alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Physiology* (Vol. 15, pp. 207-261). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1876-0813\(08\)60277-8](https://doi.org/10.1016/S1876-0813(08)60277-8)
 - Rajvaidhya, S., Nagori, B. P., Singh, G. K., Dubey, B. K., Desai, P., & Jain, S. (2012). A review on *Argemone mexicana* Linn. Indian medicinal plant. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(8), 2494. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3\(8\).2494-01](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(8).2494-01)
 - Rubio Piña, J.A. (2009) Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
 - Rubio-Piña, J., y Vázquez-Flota, F. (2013). Pharmaceutical applications of the benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana* L. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(17), 2200-2207. <https://doi.org/10.2174/15680266113139990152>
 - Safitri, A., Fatchiyah, F., Sari, D. R. T., & Roosdiana, A. (2020). Phytochemical screening, in vitro anti-oxidant activity, and in silico anti-diabetic activity of aqueous extracts of *Ruellia tuberosa* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 10(3), 101-108. <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2020.103013>
 - Salmore, A. K., y Hunter, M. D. (2001). Elevational trends in defense chemistry, vegetation, and reproduction in *Sanguinaria canadensis*. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 1713-1727. <https://doi.org/10.1023/A:1010411122739>
 - Samanani, N., & Facchini, P. J. (2001). Isolation and partial characterization of norcoclaurine synthase, the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, from opium poppy. *Planta*, 213, 898-906. <https://doi.org/10.1007/s004250100581>
 - Samanani, N., Liscombe, D. K., & Facchini, P. J. (2004). Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline

- alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*, 40(2), 302-313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02210.x>
- Samanani, N., Park, S. U., y Facchini, P. J. (2005). Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *The Plant Cell*, 17(3), 915-926. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.028654>
 - Samanani, N., Yeung, E. C., & Facchini, P. J. (2002). Cell type-specific protoberberine alkaloid accumulation in *Thalictrum flavum*. *Journal of plant physiology*, 159(11), 1189-1196. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00891>
 - Sato, F., Tsujita, T., Katagiri, Y., Yoshida, S., & Yamada, Y. (1994). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: norcoclaurine 6-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *European journal of biochemistry*, 225(1), 125-131. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00125.x>
 - Scarpella, E., & Meijer, A. H. (2004). Pattern formation in the vascular system of monocot and dicot plant species. *New Phytologist*, 164(2), 209-242. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01191.x>
 - Serrano-Gamboa JG, Xool-Tamayo JF, Loza-Muller L, Tamayo-Ordóñez YJ, Vázquez-Flota F (sometido) Identification of proteins involved in the biosynthesis of benzylisoquinoline alkaloids in seedlings of 2 the Mexican prickly poppy (*Argemone mexicana* L.) by targeted transcriptomics.
 - Shitan, N., Dalmas, F., Dan, K., Kato, N., Ueda, K., Sato, F., ... & Yazaki, K. (2013). Characterization of *Coptis japonica* CjABCB2, an ATP-binding cassette protein involved in alkaloid transport. *Phytochemistry*, 91,109-116.<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.012>
 - Singh, N., y Sharma, B. (2018). Toxicological effects of berberine and sanguinarine. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 21. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00021>
 - Sirikantaramas, S., Yamazaki, M., & Saito, K. (2008). Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochemistry Reviews*, 7, 467-477. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9080-2>
 - Takemura, T., Ikezawa, N., Iwasa, K., & Sato, F. (2013). Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 in sanguinarine biosynthesis from *Eschscholzia californica* cells. *Phytochemistry*, 91, 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.013>
 - Takeshita, N., Fujiwara, H., Mimura, H., Fitchen, J. H., Yamada, Y., & Sato, F. (1995). Molecular cloning and characterization of S-adenosyl-L-methionine: scoulerine-9-O-methyltransferase from cultured cells of *Coptis japonica*. *Plant and Cell Physiology*, 36(1), 29-36. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078741>
 - Tamayo-García, R., Narváez-Zapata, J. A., Ku-González, A., Aguilar-Espinosa, M., Gutiérrez-Pacheco, L. C., & Rivera-Madrid, R. (2022). Gene expression analysis during the fruit

- development in dehiscent and indehiscent *Bixa orellana* L. accessions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(4), 709-718. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01180-w>
- Trujillo-Villanueva, K., Rubio-Piña, J., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2010). Fusarium oxysporum homogenates and jasmonate induce limited sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnology Letters*, 32, 1005-1009. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0252-6>
 - Trujillo-Villanueva, K., Rubio-Piña, J., Monforte-González, M., Ramírez-Benítez, E., & Vázquez-Flota, F. (2012). The sequential exposure to jasmonate, salicylic acid and yeast extract promotes sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnology Letters*, 34, 379-385. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0770-x>
 - Urbanová, J., Lubal, P., Slaninová, I., Táborská, E., & Táborský, P. (2009). Fluorescence properties of selected benzo [c] phenanthridine alkaloids and studies of their interaction with CT DNA. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(4), 997-1002. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2601-7>
 - Vázquez-Flota, F., Rubio-Piña, J., Xool-Tamayo, J., Vergara-Olivares, M., Tamayo-Ordoñez, Y., Monforte-González, M., ... & Mirón-López, G. (2018). Tissue distribution of transcripts involved in biosynthesis of benzyloisoquinoline alkaloid in mature plants of *Argemone Mexicana* L. (Papaveraceae). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(1), 13-21. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.1.13-21>
 - Wang, S., Setlow, B., Setlow, P., & Li, Y. Q. (2016). Uptake and levels of the antibiotic berberine in individual dormant and germinating *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* spores as measured by laser tweezers Raman spectroscopy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(6), 1540-1546. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv504>
 - Wang, Y., Liu, Y., Du, X., Ma, H., & Yao, J. (2020). The anti-cancer mechanisms of berberine: A review. *Cancer Management and Research*, 695-702. <https://doi.org/10.2147%2FCMAR.S242329>
 - Weiss, D., Baumert, A., Vogel, M., & Roos, W. (2006). Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant, Cell & Environment*, 29(2), 291-302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01421.x>
 - Winzer, T., Gazda, V., He, Z., Kaminski, F., Kern, M., Larson, T. R., ... & Graham, I. A. (2012). A *Papaver somniferum* 10-gene cluster for synthesis of the anticancer alkaloid noscapine. *Science*, 336(6089), 1704-1708. <https://doi.org/10.1126/science.1220757>
 - Wu, Z. H., Wang, R. Z., Sun, Z. L., Su, Y., & Xiao, L. T. (2022). A mass spectrometry imaging approach on spatiotemporal distribution of multiple alkaloids in *Gelsemium elegans*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1051756. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1051756>

-
- Xie, W., Su, F., Wang, G., Peng, Z., Xu, Y., Zhang, Y., ... & Chen, R. (2022). Glucose-lowering effect of berberine on type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 4734. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1015045>
 - Xool-Tamayo, J. F., Monforte-González, M., Rubio-Piña, J., Mirón-López, G., & Vázquez-Flota, F. (2016). Early developmental onset of alkaloid biosynthesis in Mexican poppy (*Argemone Mexicana* L) Papaveraceae. *Phytochemistry Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.020>
 - Xu, L., Hong, S., Sun, N., Wang, K., Zhou, L., Ji, L., & Pei, R. (2016). Berberine as a novel light-up i-motif fluorescence ligand and its application in designing molecular logic systems. *Chemical Communications*, 52(1), 179-182. <https://doi.org/10.1039/C5CC08242K>
 - Yamamoto, K., Takahashi, K., Mizuno, H., Anegawa, A., Ishizaki, K., Fukaki, H., ... & Mimura, T. (2016). Cell-specific localization of alkaloids in *Catharanthus roseus* stem tissue measured with Imaging MS and Single-cell MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(14), 3891-3896. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521959113>
 - Yang, Y., Yang, X., Jiao, C. X., Yang, H. F., Liu, Z. M., Shen, G. L., & Yu, R. Q. (2004). Optical sensor for berberine utilizing its intrinsic fluorescence enhanced by the formation of inclusion complex with butylated- β -cyclodextrin. *Analytica Chimica Acta*, 513(2), 385-392. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.022>
 - Ziegler, J., y Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 735-769. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730>
 - Zou, C., Wang, Y., Zou, H., Ding, N., Geng, N., Cao, C., & Zhang, G. (2019). Sanguinarine in *Chelidonium majus* induced antifeeding and larval lethality by suppressing food intake and digestive enzymes in *Lymantria dispar*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 153, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.10.003>

ANEXO

An Update of the Sanguinarine and Benzophenanthridine Alkaloids' Biosynthesis and Their Applications

Abstract: Benzophenanthridines belong to the benzyloquinolic alkaloids, representing one of the main groups of this class. These alkaloids include over 120 different compounds, mostly in plants from the Fumariaceae, Papaveraceae, and Rutaceae families, which confer chemical protection against pathogens and herbivores. Industrial uses of BZD include the production of environmentally friendly agrochemicals and livestock food supplements. However, although mainly considered toxic compounds, plants bearing them have been used in traditional medicine and their medical applications as antimicrobials, antiprotozoals, and cytotoxic agents have been envisioned. The biosynthetic pathways for some BZD have been established in different species, allowing for the isolation of the genes and enzymes involved. This knowledge has resulted in a better understanding of the process controlling their synthesis and an opening of the gates towards their exploitation by applying modern biotechnological approaches, such as synthetic biology. This review presents the new advances on BDZ biosynthesis and physiological roles. Industrial applications, mainly with pharmacological approaches, are also revised.

Keywords: alkaloids; benzophenanthridines; benzyloquinoline; natural products; specialized metabolism.

1. Introduction

Benzophenanthridines (BZD) represent one of the 11 classes of benzyloquinoline alkaloids (BIA). BZD include over 120 alkaloids mainly spread in plants from the Fumariaceae, Papaveraceae, and Rutaceae families, within the Ranunculales and Sapindales orders (shing et al., 2019). Structurally, BZD are tetracyclic compounds, which include a non-aromatic heterocyclic system (B ring). Depending on the ring organization, BZD could be classified in three different groups: Type I (hexahydrobenzo[c]phenanthridines) includes two aromatic (A and D) and aliphatic (B and C) rings, in which the N atom in B is usually methylated. In BZD type II (dihydrobenzo[c]phenanthridines), the N atom is also methylated; however, ring B could be

absent when the C7-C8 bond is open (type II-1) or modified with a complex substituent at C8 (type II-2). Regardless of ring B being absent, rings A, C, and D are aromatic systems. Finally, BDZ type III results from the N protonation of BDZ type I or II, leading to the corresponding ammonium quaternary salts (Figure 1) (Hang et al., 2016; Bisai et al., 2019). Depending on the chemical modifications within these basic structures, up to seven groups can be distinguished: hexahydrobenzophenanthridines (type I), seco-benzophenanthridines (type II-1), dimeric dihydrobenzophenanthridines (type II-2), N-demethylbenzophenanthridines, dihydrobenzophenanthridines, benzophenanthridones, and quaternary benzophenanthridine alkaloids (type III; Figure 1) (Hang et al., 2016; Bisai et al., 2019).

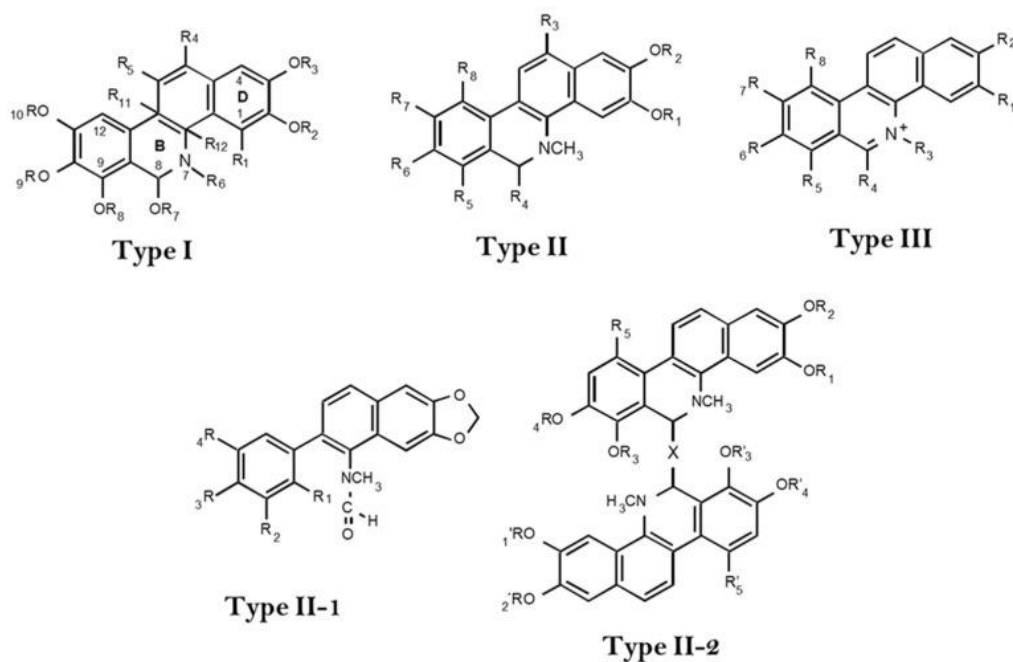


Figure 1. Chemical structure of the different benzophenanthridines (BZD).

Plants bearing BDZ have had important roles in human traditional medicine in both the old and new world cultures for centuries. For example, the great celandine (*Chelidonium majus* L.; Papaveraceae) was used by ancient Greeks to treat eye cataracts, whereas the fern leafed corydalis (*Corydalis cheilanthifolia* Helms; Fumarioideae/Papaveraceae) is mentioned in antique Chinese treatises for irregular menses. In the Americas, prior to Europeans' arrival, the prickly poppy (*Argemone mexicana* L., Papaveraceae) was recommended to remove genital warts and for other skin infections (Rubio-Piña y

Vázquez-Flota, 2013) Some of the alkaloids found in these plants are shown in Figure 2 and include sanguinarine (I) and its reduced dihydro form, dihydrosanguinarine (II), chelerythrine (III), cheilanthifoline (IV), corydine (V), corydaline (VI), and dehydrocorydaline (VII), among others. Table 1 lists some plant species that accumulate in BZD alkaloids as well as their different uses for medicinal purposes. There is an increasing interest in sanguinarine and other BZD alkaloids due to their diverse pharmacological effects and possible functions in plant–environment interactions. Here, a review of the new advances on the BDZ biosynthetic process and physiological roles is presented. Industrial applications, mainly with pharmacological approaches, are also revised.

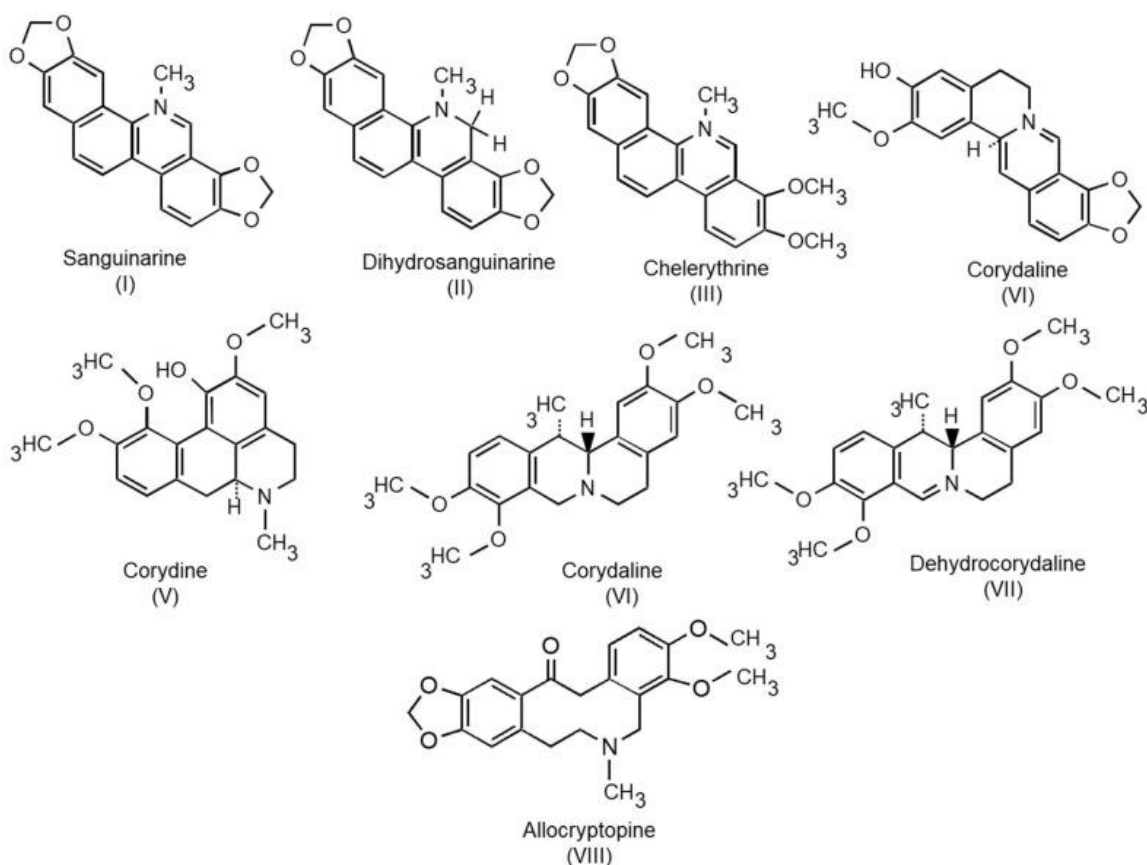


Figure 2. Chemical structure of the BZD analyzed in this review.

Table 1. A few plants bearing BZD alkaloids and their traditional medicinal uses.

| Plant Species | Applications | References |
|--|---|---|
| <i>Argemone mexicana</i> L. (Papaveraceae) | Antiprotozoals: to dissolve eye cataracts, to remove warts, and to treat skin infections | Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013 |
| <i>Chelidonium majus</i> L. (Papaveraceae) | Skin, liver, and eye diseases; antiparasitic | Zielińska et al., 2018 |
| <i>Corydalis yanhusuo</i> Chou (Papaveraceae) | Analgesic for chest pain, post-partum blood stasis, and spleen and stomach stasis | Liao et al., 2016. Zhang et al., 2020. |
| <i>Macleaya cordata</i> Willd (Papaveraceae) | Anti-inflammatory and antimicrobial activities | Liu et al., 2017. |
| <i>Eschscholzia californica</i> Cham (Papaveraceae) | Sedative, anxiolytic, analgesic, soporific, spasmolytic, diuretic, and diaphoretic | Rolland et al., 1991. |
| <i>Sanguinaria canadensis</i> L. (Papaveraceae) | To treat cold and congestion, sore throats, emetic, abdominal cramps, lumps, wound infections, and rheumatism | Croaker et al., 2016 |

2. The Biosynthesis of Sanguinarine and Related BZD: Physiological Roles and Applications

The following sections present a view on the most relevant advancements on the topic.

2.1. Synthesis and Regulation of Sanguinarine and Related Alkaloids

2.1.1. The Biosynthetic Pathway. The synthesis of BZD shares initial reactions with other BIA (Figure 3), starting with two units of L-tyrosine. One of them is decarboxylated, forming tyramine, which is then hydroxylated into dopamine. Alternatively, 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa) could be directly decarboxylated. Regardless of how dopamine is formed, it is later condensed with 4-hydroxyphenylacetaldehyde (4HPDA), which is the result of tyramine deamination, producing s-norcoclaurine, the central trihydroxylated intermediary from which all the wide BIA diversity will rise (Figure 3). Enzymes involved in these reactions are shown in Table 2. Among those, norcoclaurine synthase (NCS) has been studied in different species, displaying a positive substrate-binding typical of limiting enzymes (Samanani y Facchini, 2001) Norcoclaurine is transformed in s-reticuline after an ordered series of reactions involving O-6 methylation, N

methylation, C3' hydroxylation, and O-4' methylation (Figure 3 and Table 2). Although the purified enzymes involved in these reactions could accept structurally related substrates in *in vitro* assays, all of them display a marked preference for BIA intermediaries (Hagel y Facchini, 2013). Besides, alternative products could be formed in some species, which results in nearly 300 different alkaloids (Figure 3). This catalytic flexibility, associated to a recent evolutive divergence, is one of the reasons for BIA diversity and the restricted occurrence of different BIA types to a few related species (Liscombe et al., 2005).

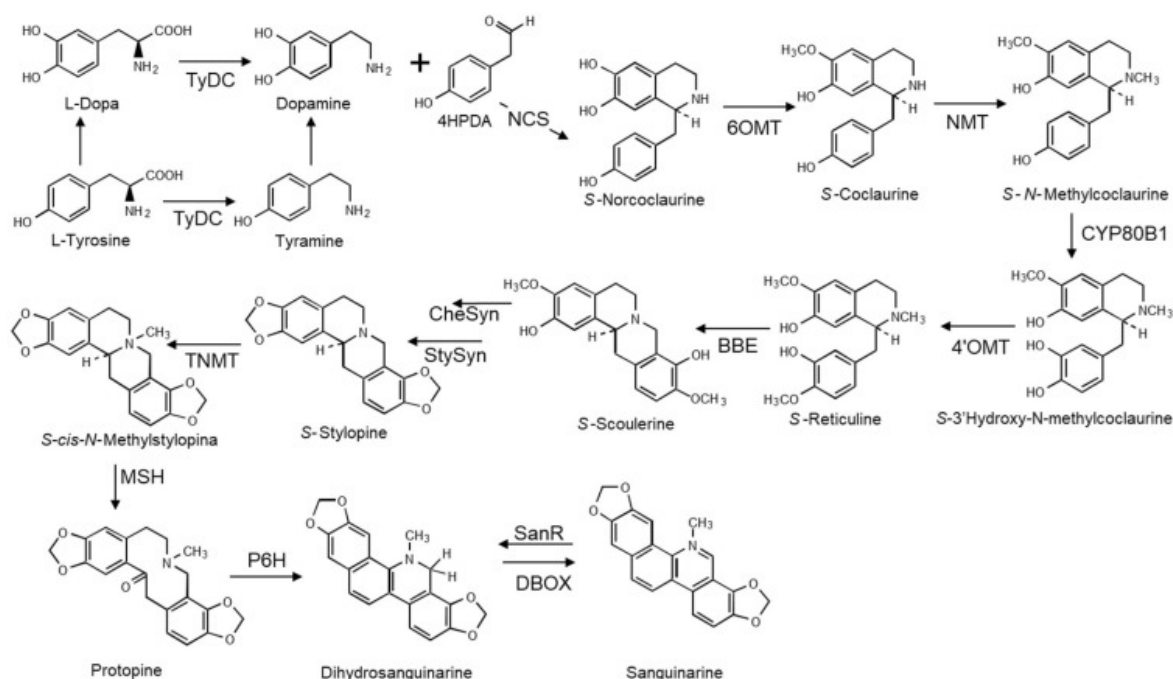


Figure 3. Biosynthetic pathways leading to sanguinarine. TyDC, l-tyrosine decarboxylase; NCS, s-norococlaurine synthase; 6OMT, s-norococlaurine-6-O-methyltransferase; BBE, reticuline oxidase: berberine bridge enzyme; CheSyn, cheilanthifoline synthase; StySyn, stylopine synthase; TNMT, s-tetrahydroprotoberberine N-methyltransferase; MSH, methyltetrahydroprotoberberine 14-monooxygenase; P6H, protopine 6-hydroxylase; DBOX, dihydrobenzophenanthridine oxidase; and SanR, sanguinarine reductase.

Table 2. Enzymes involved in sanguinarine biosynthesis, describing reaction catalyzed and subcellular localization. Data were collected from UniProt Beta (<https://beta.uniprot.org/> (accessed on 12 December 2021)).

| Enzyme and EC Number | Function | Subcellular Localization | Organisms and Acc. Number |
|--|--|---|---|
| I-Tyrosine decarboxylase (TyDC) EC 4.1.1.25 | Decarboxylates of I-tyrosine to produce tyramine | Cytosol | <i>P. somniferum</i> (P54768) <i>Thalictrum flavum</i> (Q9AXN7) <i>A. mexicana</i> (D2SMM8) |
| s-Norcoclaurine synthase (NCS) EC 4.2.1.78 | Condenses dopamine and 4-HPDA, producing s-norcoclaurine | Endoplasmic reticulum lumen and vacuole | <i>P. somniferum</i> (Q4QTJ2) <i>T. flavum</i> (Q67A25) <i>A. mexicana</i> (EU881891) |
| s-Norcoclaurine-6-O-methyltransferase (6OMT) EC 2.1.1.128 | Transfers a methyl group from SAM to s-norcoclaurine, forming coclaurine, and to r,s-norcoclaurine, forming r-norprotosinomenine, s-norprotosinomenine, and (r,s)-isoorientaline | Membrane integral protein | <i>P. somniferum</i> (Q6WUC1) <i>Coptis japonica</i> (Q9LEL6) |
| Reticuline oxidase: berberine bridge enzyme (BBE) EC:1.21.3.3 | Converts s-reticuline in s-scoulerine by forming of a carbon-carbon bond (C8) between the N-methyl group and the phenolic ring | Cytoplasmic vesicles | <i>P. somniferum</i> (P93479) <i>E. californica</i> (P30986) <i>A. mexicana</i> (D2SMM9) |
| Cheilanthifoline synthase (CheSyn) EC:1.14.19.65 | Converts s-scoulerine into r,s-cheilanthifoline by forming a methylenedioxy bridge | Endoplasmic reticulum membrane | <i>E. californica</i> (B5UAQ8) <i>A. mexicana</i> (CYP719A14) |
| Stylopine synthase (StySyn) EC:1.14.19.73 | Forms a methylenedioxy bridge on ring A (2,3 position), transforming s-cheilanthifoline to s-stylopine, s-scoulerine to s-nandinine, and s-tetrahydrocolumbamine to s-canadine | Smooth endoplasmic reticulum membrane | <i>E. californica</i> (Q50LH4) <i>A. mexicana</i> (B1NF19) |
| s-Tetrahydroprotoberberine N-methyltransferase TNMT EC:2.1.1.122 | Converts stylopine, canadine, and tetrahydropalmatine to their corresponding N-methylated products | Cytosol | <i>P. somniferum</i> (Q108P1) <i>E. californica</i> C3SBS8 |

| | | | |
|--|--|--------------------------------|---|
| Methyltetrahydroprotoberberine 14-monooxygenase (MSH) EC:1.14.14.97 | Transforms, by oxidation, N-methylstylopine and N-methylcanadine into protopine and allocryptopine, respectively | Membranal protein | <i>P. somniferum</i> (L7X3S1) |
| Protopine 6-hydroxylase (P6H) EC:1.14.14.98 | Converts protopine and allocryptopine to dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine by hydroxylation at position 6 | Endoplasmic reticulum membrane | <i>E. californica</i> (F2Z9C1) <i>P. somniferum</i> (L7X0L7) |
| Dihydrobenzophenanthridine oxidase (DBOX) EC 1.5.3.12 | Catalyzes a two-electron oxidation of dihydrosanguinarine, forming sanguinarine | Endoplasmic reticulum | <i>P. somniferum</i> (AAC61839) |
| Sanguinarine reductase (SanR) EC:1.3.1.107 | Catalyzes reduction of benzophenanthridines, preferentially sanguinarine, to the dihydroalkaloids; involved in detoxifying the phytoalexins produced by plant itself | Vacuole | <i>E. californica</i> (D5JWB3) |

Reticuline represents another important branching point, leading, on one hand, to the formation of morphinan and protomorphinan alkaloids, and to the groups of protoberberines, secoberberines, protopines, and BZD (Liscombe et al., 2005). The first reaction in this set is the formation of the methylene bridge at C8, producing *s*-scoulerine, catalyzed in a stereo-specific manner by the berberine bridge enzyme (BBE; Figure 2), which is rapidly induced in response to pathogen and chemical elicitors, and thus related to plant defense in different species (Daniel et al., 2017). Oxidation of methoxy groups on rings A and D form the corresponding methylenedioxy bridges rendering *s*-chelantifoline (III) and *s*-stylopine, respectively (Figure 3) (Beaudoin y Facchini, 2014; Chávez et al., 2011). N-methylation of stylopine to *s*-N-methylstylopine and its further oxidation produces protopine, which is then 6-hydroxylated, driving it to the spontaneous opening of the C ring as well as to the rearrangement and dehydration yielding dihydrosanguinarine (II), the first BDZ alkaloid, which is then oxidized to sanguinarine (I) (Hagel y Facchini, 2013) (Figure 3 and Table 2). This biosynthetic route, proposed earlier by the trace of radiolabeled precursors (Reed y Hudlicky, 2015) has been confirmed by biochemical and genetic studies, including high throughput approaches in different species such as *Argemone mexicana* (Chávez et al., 2011), *Corydalis yanhuso* (Liao et al., 2016), *Eschscholzia californica* (Yamada et al., 2021), *Macleaya cordata* (Liu et al., 2017) and *Papaver somniferum* (Hagel y Facchini, 2013) among others. However, species-

associated particularities have been noticed in some cases. For example, in *A. mexicana*, CYP719A13 encodes a cytochrome P450 with activity of both stylophine and canadine synthase since it can accept cheilanthifoline (IV) as well as tetrahydrocolumbamine as substrates, transforming them into stylophine and canadine, respectively, and hence participating in sanguinarine (I) and berberine synthesis (Chávez et al., 2011). Moreover, enzymes involved in the formation of other BZD, such as chelerythrine (III), have also been identified by combining transcriptomic and metabolomic approaches (Liu et al., 2017). Figure 3 depicts the reactions involved in the synthesis of selected BZD alkaloids, showing the acronyms for the enzymes involved in each reaction. Table 2 lists details of the identified enzymes.

2.1.2. Tissue Distribution and Regulation. Commonly, sanguinarine (I) and other BZD alkaloids are synthesized in underground tissues in species of *Argemone*, *Papaver*, and *Sanguinaria*, where enzymes are distributed between the smooth endoplasmic reticulum (SER), both inside in the lumen and membrane-bound, and the (Beaudoin y Facchini, 2014; Loza-muller et al., 2021 A) After their synthesis, alkaloids are accumulated in vacuoles with the participation of a vesicle-mediated transport system (Weiss et al., 2006). In fact, this vesicle-mediated transport system allows for the mobilization of intermediaries, as they are being modified by the membrane-bound enzymes, in the track from SER to vacuole. Moreover, conditions promoting sanguinarine (I) synthesis also concomitantly induce major SER ultrastructural modifications (Alcantara et al., 2005)

However, both synthesis and accumulation could also take place in aerial tissues in *Bocconia*, *Chelidonium*, and *Macleaya* (Liu et al., 2017; Yu et al., 2014) Mobilization of sanguinarine (I) through ABCB-type transporters has been determined in *A. mexicana* and *E. californica*. EcABCB1 was preferentially expressed in the roots of *E. californica*, which is the major site of accumulation for this alkaloid (Nwanyichukwu, 2014). Interestingly, AmABCB1 from *A. mexicana* was reported mainly to be expressed in seeds with an important expression also observed in roots and in very low levels in leaves (Loza-muller et al., 2021 B). The specific role that sanguinarine could have in seeds of *A. mexicana* is unknown but it is suggested that it might act as a defense against herbivores due to its high toxicity.

Genes involved in the biosynthesis of sanguinarine (I) and other BIA have been reported under transcriptional regulation of different elements, such as basic Helix-Loop-Helix (bHLH) and WRKY proteins. In *E. californica*, a number of sanguinarine biosynthetic genes were under the control of two bHLH proteins, named EcbHLH1-1 and -2, whereas tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase (TNMT) was regulated by EcbHLH1-1 and EcbHLH1-2-controlled 4'OMT. Interestingly, 6'OMT and stylophine synthase CYP719A3 (Figure 2) were regulated by both proteins (Yamada et al., 2015) The heterologous expression of a *Coptis japonica* WRKY protein (CjWRKY) in *E. californica*-cultured cells increased the production of sanguinarine and 14 other components, and this was related to an increased expression of biosynthetic genes (Yamada et al., 2017).

2.2. Physiological Roles of Benzophenanthridines.

Specialized metabolites play critical roles in plant fitness to their surroundings. While some of them can act to attract pollen and seed dispersers, others exert toxic effects to vertebrate and invertebrate animals, fungi, and bacteria. As other plant alkaloids, BZD display toxic effects against herbivores (Salmore y Hunter, 2001) and different soil bacteria and fungi (Liu et al., 2009). Sanguinarine has been the most studied among BZD alkaloids, displaying both herbivore deterrent activity as well as antimicrobial effects. Structural features conferring these physiological effects are related to BZD planar configuration, which allows them to intercalate in nucleic acids, affecting both DNA and RNA synthesis. Besides, as heteroaromatic iminium cations, BZD could bind to negatively charged membrane surfaces and proteins, and react with SH-compounds, interfering, in such a way, with the function of several cytosolic and membranal proteins, such as collagenase, tubulin assembly, and Na⁺/K⁺ ATPases, among others (Singh y Sharma, 2018)

Sanguinarine (I), as other alkaloids, modifies its chemical behavior depending on the external pH. It acts as a polar, hydrophilic iminium cation or as a lipophilic, uncharged alkoamine at pH values lower or higher than six, respectively (Hang et al., 2016). In this way, both forms could coexist at a physiological pH. Interestingly, although bioactivity is associated with the iminium form, the low polar alkanolamine exhibits membrane permeability, which allows the alkaloid free movement across organelle membranes. Once inside the compartment's lumen, interaction with an acidic milieu, such as the presence of a nucleic acid, produces an equilibrium shift towards the iminium active form (Hang et al., 2016; Singh y Sharma, 2018). Alternating these chemical forms ensures movement of the inactive, low toxic forms, which would turn into active ones once the target is reached, without participation of protein receptors.

2.2.1. Herbivore Deterrence of Benzophenanthridines. Sanguinarine (I) interferes with the nerve impulse transmission in arthropods and vertebrates due to its notable inhibitory effects on choline acetyltransferase activity (IC₅₀ 284 nM). It also hinders nicotinic, muscarinic, and serotonin-2 receptors, impairing, in this way, nerve transmission (Cahlíková et al., 2010; Schmeller et al., 1997; Wink et al., 1998) In addition to these effects, sanguinarine also reduces the feeding activity of *Lymantria dispar* (Lepidoptera) larvae on *C. majus* plants (LD₅₀ of 4.963 µg/larva). Overall, these responses, which eventually lead to larvae mortality, were associated to the inhibition of digestive enzymes, such as α-amylase, lipase, and serine protease at the transcriptional level (Zou et al., 2019)

Interestingly, herbivory induces an increase in the contents of sanguinarine in plants, such as *E. californica* (Leger y Forister, 2005), *Chelidonium majus* (Zou et al 2019), *M. cordata* (Liu et al., 2009) and *Sanguinaria canadensis* (Watts et al., 2011). Other BZD, such as allocryptopine (VIII), cheilanthifoline (IV), and chelerythrine (III) with similar insecticidal effects, although to a lesser extent, were also augmented in some of these species, suggesting a common effect of BZD on predators' nerve impulses and herbivore deterrence.

2.2.2. Antimicrobial Activity of Benzophenanthridines. Most studies on BZD antimicrobial activity are related to their potential as pharmaceuticals with relatively few published works on their direct role in plant chemical defense. Different fungi-caused diseases, such as powdery mildew, blight, and root rot, have been observed in plants producing BZD alkaloids, including *Eschscholzia* (Camacho-Tapia et al., 2018), *Macleaya* (Park et al., 2012; Zhou et al., 2020) and *Papaver* (Watts et al., 2011; O'Neill et al., 2000), among others. *Fusarium oxysporum* and different species of *Erysiphe*, *Dendryphion*, and *Pleospora* have been identified as the etiological agents. Interestingly, even when sanguinarine (I), chelerythrine, and other BZD show antifungal activities (Yang et al., 2012; Yang et al., 2015) the direct effects of these fungi infections on alkaloid biosynthesis have not been analyzed in planta, despite abundant studies in in vitro cultures (Hagel et al., 2015). For instance, cell cultures of *A. mexicana* respond to the addition of *F. oxysporum* homogenates by increasing sanguinarine formation after activation of the octadecanoic signaling pathway (Trujillo-villanueva et al., 2010; Guizar Gonzalez et al., 2016). Similar responses have also been noted in *Eschscholzia* (Weiss et al., 2006) and *Papaver* (Shing et al., 2019), among others. Moreover, complex signaling pathways leading to the activation of alkaloid synthesis, which involve heterotrimeric G proteins, phospholipase A₂, and cytoplasmic pH changes, have been established in cell cultures, suggesting an important role of these alkaloids in chemical defense (Farber et al., 2003; Roos et al., 2006).

Sanguinarine (I), along with chelerythrine (III) and corydaline (VI) to a lesser extent, displayed fungicidal activity against eight phytopathogenic fungi, including *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, and *Magnaporthe oryzae*. These BZD-induced morphological abnormalities in mycelia resulted from deformed hyphae that eventually collapsed due to the disruption of membranes' integrity. Moreover, an upsurge of reactive oxygen species (ROS) was observed in fungi exposed to BZD, mainly to sanguinarine, and it was associated to alterations in the redox potential of mitochondrial membranes and modifications in the nuclear morphology (Zhao et al., 2019). These hyphal deformations in *M. oryzae* resulted in a lower appressorium tissue penetration in barley and disturbed the proper germ tubes' formation from spores. Such effects are derived from the interference of sanguinarine (I) with the fungus cAMP-mediated signaling pathways (Anjago et al., 2021) and could explain the antifungal effects.

Sanguinarine (I) and chelerythrine (III) also showed antimicrobial effects against soil-borne pathogenic bacteria, such as *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas lachrymans*, and *Xanthomonas vesicatoria* (Beuria et al., 2005). These effects are mainly due to alkaloid interference in the assembly of the FtsZ protein, a tubulin homologous, into filaments that conform the cytokinesis contracting belt, thus hampering bacterial fission. A direct binding of alkaloids' dimethoxy and isoquinoline groups to the protein domains involved in polymerization has been observed (Mingorance et al., 2010).

Interestingly, even when different pathogenic viruses have been isolated from *Papaver* species, which accumulates sanguinarine (Tang et al., 2016; Glasa et al., 2018), no studies on the effect of such infections on alkaloid synthesis have been reported.

2.3. Medical and Industrial Applications of Benzophenanthridines

Perhaps the main industrial use of BDZ in commercial products is the manufacturing of livestock feed additives from *M. cordata* (Sangrovit®; Phytobiotics Futterzusatzstoffe GmbH; Eltville am Rhein, Germany). The product is sold as pellets or pearls made from dried plant material that contain sanguinarine, protopine, and chelerythrine in no less than 60% on a dry weight basis and it is claimed to improve food digestibility in broilers, swine, cattle, sheep, and farmed fisheries. These effects have been related mainly to alkaloids, helping to control intestinal infections (Dong et al., 2021). Interestingly, sanguinarine (I) inhibits the formation of biofilms by different enterobacteria, such as carbapenem-resistant *Serratia marcescens* and *Providencia rettgeri* (Fu et al., 2018; Galadari et al., 2017). Additionally, sanguinarine could avoid inflammation and retard amino acid transit by inhibiting amino acid decarboxylases' action (Fu et al., 2018). Until recently, antiplaque mouth washes and toothpaste containing extracts from *S. canadensis* were commercialized (Viadent®; Colgate-Palmolive Inc, New York City, NY, USA), but they are no longer available (Croaker et al., 2016). Extracts of *A. mexicana* are mixed with other plants in the elaboration of ecofriendly insecticides (BioDie; Promotora Técnica Industrial SA, Jiutepec México) (Rubio-Piña y Vazquez-Flota, 2013). Noteworthy is that, although mainly considered toxic compounds (Galadari et al., 2017), BZD alkaloids also display similar pharmaceutical effects, although with different efficacy, due to the same structural features exposed above. BZD exhibit hypotensive, antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory properties (Fu et al., 2018). Moreover, cytotoxic and cytostatic effects on different human cancer cells have also been reported (Singh y Sharma, 2018). No cell receptors for these alkaloids have been described; hence, their physiological activity depends on their diffusion into cells and chemical reactivity with membranes, nucleic acids, and proteins, and their consequent interference in different biochemical processes. For example, the disruption of membrane electrochemical gradients, caused by inhibition of Na⁺/K⁺ ATPases, also hampers different signal transduction pathways, including those mediated by mitogen-activating protein kinases (MAPK), reactive oxygen species (ROS), and intracellular calcium, which, in turn, could be involved in cell death and apoptosis pathways (Khan et al., 2021). It has been observed that chelerythrine, chelidonine (stylophorin), cordatine, and nitidine induce ROS formation in tumoral cell lines from diverse human tissues, including bladder, breast, glioma, lung, kidney, pancreas, prostate, skin, stomach, and uvea, among others (Singh y Sharma, 2018; Galadari et al., 2017; Khan et al., 2021; Akhtar et al., 2019). ROS accumulation induced by BZD activates different components of the apoptotic transduction pathways, including both caspase-dependent and

independent routes (Khan et al., 2021). Such an increase in ROS cell levels is therapeutically valued since recent anticancer approaches are aimed at agents that trigger a controlled upsurge, leading to the activation of the antioxidant cell response, which, in turn, would attenuate tumor development (Singh y Sharma, 2018; Akhtar et al., 2019; Perillo et al., 2020). Besides these pleiotropic effects and nucleic acid intercalation, direct interaction with enzymes, such as DNA pol, topoisomerases, etc., and membrane lipid peroxidation also account for bioactivity. Increased ROS levels, induced by BZD, also have additional beneficial medical implications for type 2 diabetes (T2D) treatment. Extracts from *Fumaria parviflora* have shown hypoglycemic effects in rats, which were associated to sanguinarine contents, and bioinformatic prospections pulled out sanguinarine (I) in the top 20 out 6100 candidates with alleged antidiabetic properties (Wang et al., 2014). Recently, sanguinarine has been shown to modulate ROS accumulation in kidney tissues of streptozotocine-induced diabetic rats. This not only reduced the expression of tumoral markers but also resulted in protection against diabetic nephropathy (Zhong et al., 2021). These activities rely on their structural features. Structural requirements for activity include planar configuration, N methyl substitutions, hydroxylation patterns, and the fusion of the B/C ring (Hang et al., 2016; Bisai et al., 2019; Galadri et al., 2017).

Sanguinarine (I), chelerythrine (III), and their direct dihydro derivatives are the most studied alkaloids among BZD. However, other minor compounds also display similar physiological activities, although with wide variations in their effective doses (Hang et al., 2016; Bisai et al., 2019). Table 3 shows some of the main BZD alkaloids with their ascribed pharmacological activity and the biochemical mechanisms involved.

Table 3. Pharmacological effects of sanguinarine and related alkaloids.

| Alkaloid | Effects | Mechanism |
|------------------|--|--|
| Sanguinarine (I) | Antimicrobial | Halts formation of contracting belt by binding to the FtsZ protein |
| | | Interferes with carbohydrate metabolisms by inhibiting glucose transport and the 2-ketogluconate pathway |
| | | Increases sensitivity to β -lactam antibiotics |
| | Antiretroviral | Inhibits transcriptase reverse |
| Anticancer | Cytotoxic Intercalates DNA and RNA, affecting topoisomerase action and cell division Arrests cell cycle at S and G1 phases by interfering with cyclins and CDK Activates and modulates ROS depending on apoptotic pathways through effects on p53, Bcl-2, caspases, IAP, and autophagy affecting MAPK and ERK Tumor development and metastasis Restrains neovascularization by downregulating expression of the | |

| | | |
|--------------------------|--------------------------------|---|
| | | endothelial growth factor Reinforces cell-tight junction Chemosensitization Potentiates cytotoxicity of different agents |
| | Anti-inflammatory | Reduces the release of proinflammatory cytokines TNF- α ; IL-1 β ; and IL-6 |
| Chelerythrine (III) | Adjuvant in COVID-19 treatment | Prevents hyper-inflammatory immune response regulating signaling pathways mediated by Nrf2, NF- κ B, and p38 MAPK |
| | Anti-inflammatory | Reduces protein kinase C- α / β inhibitory activity, preventing cerebral vasospasm, eryptosis, and pulmonary inflammation and fibrosis |
| | Antiviral | Viral RNA-intercalation |
| | Anticancer | Reduces phosphorylation of ERK and Akt, downplaying the activation of p53, B-cell Bcl-2, caspases, and PARP |
| Cheilanthifoline (IV) | Anti-inflammatory | Reduces the release of proinflammatory cytokines and anti-AChE |
| | Antimicrobial | Hinders expression of MRSA genes and disrupts membrane integrity |

3. Concluding Remarks

In plants, BDZ alkaloids are part of an elaborated chemical defensive system sensitive to potentially harmful environmental stimuli, such as microbial infections and insect foraging. Interaction with these biological agents sets up a chain of biochemical events leading to the transcriptional activation of genes involved in their synthesis and mobilization (Weiss et al., 2006). The defensive role of secondary metabolites, such as alkaloids, in plants has turned into a valuable biotechnological tool, which is frequently used in in vitro cell cultures to increase their accumulation. Cell cultures submitted to conditions mimicking microbial infection or environmental hazards respond by increasing transcriptional activity, leading to the synthesis of these defensive compounds (the process is known as elicitation) (Vazquez-Flota et al., 2003). Cell cultures from different species from the Papaveraceae family including *A. mexicana*, *E. californica*, *M. cordata*, and *P. somniferum*, show this response when challenged by exposition to different stimuli. Besides its potential for commercial exploitation, elicitation has also allowed for the discovery of new enzymes (Takemura et al., 2013) and has led to the design of ingenious approaches for chemical semisynthetic processes. For example, recently, an interest on BZD dihydro forms, mainly dihydrosanguinarine (II), has surged due to its minor cytotoxicity (Wang et al., 2021). In plants, sanguinarine reductase (SanR; Figure 3) leads to the NADH-dependent reduction of sanguinarine and other BZD to the lesser toxic dihydro derivatives. This is part of a mechanism to avoid cell damages caused by an increase in the alkaloid accumulation in response to pathogen infection. This response has instigated the development of a biomimetic approach for the reduction of the N₇=C₈ double-bond located in the B ring by incubating sanguinarine (I) with NADH under 455 nm

blue radiation. This reaction produced a dihydrosanguinarine (II) dimer but also can be applied for the semi-synthesis of different natural substituted dihydroBZD (Wang et al., 2021). In fact, an efficient total synthesis of selected BZD, such as chelerythrine (III) and sanguinarine (I), has been recently reported using affordable materials, such as 7-azabenzonorbomadiene and based on enzyme mechanisms (Aravindan y Jeganmohan, 2021). However, although well-established at the cellular level, details on the operation of these mechanisms in integral tissues or the whole plant are yet to be discovered. Moreover, the complete biosynthetic pathway required for sanguinarine (I) and other BZD alkaloids has been isolated from different species, and some regulatory genes, and their corresponding cis-elements are also available. This has allowed for dissecting which components of the pathway are responsive to specific biochemical mediators and the mechanisms involved in this response. On the other hand, although still under observation due to undesirable side effects, the medical applications of sanguinarine (I) and related alkaloids is an area of intensive research (Table 3). Interestingly, BZD have been considered both cancerogenic and anticancer agents (Croaker et al., 2017). Epidemiological evidence links the use of mouthwashes added with sanguinarine to maxillary vestibule oral leukoplakia as well as its involuntary consumption in contaminated mustard oil to gall bladder (Croaker et al., 2016 y 2017). However, different genotoxicity assays and animal tests for cancer genesis often deliver non-conclusive results. Therefore, neither sanguinarine (I) nor other BZD are currently listed as proved cancer-producing agents (Croaker et al., 2017). The BZD planar structure is similar to other polyaromatic hydrocarbon carcinogens that allow for intercalation in the DNA. Besides, BZD induce cell oxidative burst with ROS formation. Paradoxically, although ROS accumulation triggered by BZD could cause DNA damage, it also could be the basis of their therapeutical application against cancer. This may be explained by the fact that a controlled increase in ROS could induce the activation of internal cell mechanisms directed to the mitigation of oxidative harm. Moreover, sanguinarine and other BZD inhibited the P-glycoprotein/ABCB1 and related ABCB5 in drug resistance in multidrug-resistant tumor lines, increasing their sensitivity to cytotoxic drugs, which might allow for better treatments (Saeed et al., 2018). In this way, knowledge generated on the synthesis and regulation of these alkaloids could now be directed towards the generation of tools for their commercial exploitation by modern biotechnological methods, including cell culture technology and synthetic biology approaches. Scaling up for massive culture of elicited cell suspension has been reported and the introduction of the complete sanguinarine (I) pathway to yeast cells has been recently achieved (Fossati et al., 2014). Moreover, the availability of the complete set of genes involved in sanguinarine (I) synthesis, as well as some of the regulatory genes and those involved in its mobilization, would allow for improving not only the enzymatic catalysis by gene edition but also the internal cell traffic of intermediaries, resulting in more efficient processes for the formation of these valuable alkaloids.

4. References in this review

- Akhtar, S., Achkar, I. W., Siveen, K. S., Kuttikrishnan, S., Prabhu, K. S., Khan, A. Q., ... & Uddin, S. (2019). Sanguinarine induces apoptosis pathway in multiple myeloma cell lines via inhibition of the Jak2/STAT3 signaling. *Frontiers in oncology*, 9, 285. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00285>
- Anjago, W. M., Zeng, W., Chen, Y., Wang, Y., Biregeya, J., Li, Y., ... & Chen, M. (2021). The molecular mechanism underlying pathogenicity inhibition by sanguinarine in *Magnaporthe oryzae*. *Pest Management Science*, 77(10), 4669-4679. <https://doi.org/10.1002/ps.6508>
- Aravindan, N., & Jeganmohan, M. (2021). A short total synthesis of benzophenanthridine alkaloids via a rhodium (III)-catalyzed C–H ring-opening reaction. *The Journal of Organic Chemistry*, 86(21), 14826-14843. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c01612>
- Beuria, et al., (2005).
- Bisai, V., Saina Shaheeda, M. K., Gupta, A., & Bisai, A. (2019). Biosynthetic relationships and total syntheses of naturally occurring benzo [c] phenanthridine alkaloids. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 8(7), 946-969. <https://doi.org/10.1002/ajoc.201900244>
- Cahlíková, L., Opletal, L., Kurfürst, M., Macáková, K., Kulhánková, A., & Hošťálková, A. (2010). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Natural product communications*, 5(11). <https://doi.org/10.1177/1934578X1000501110>
- Camacho-Tapia, M., Sánchez-Soto, V., Correia, K. C., Pastirčáková, K., & Tovar-Pedraza, J. M. (2018). Powdery mildew of California poppy caused by *Erysiphe eschscholziae* in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(3), 461-466. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1498807>
- Croaker, A., King, G. J., Pyne, J. H., Anoopkumar-Dukie, S., & Liu, L. (2016). *Sanguinaria canadensis*: traditional medicine, phytochemical composition, biological activities and current uses. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1414. <https://doi.org/10.3390/ijms17091414>
- Croaker, A., King, G. J., Pyne, J. H., Anoopkumar-Dukie, S., Simanek, V., & Liu, L. (2017). Carcinogenic potential of sanguinarine, a phytochemical used in 'therapeutic' black salve and mouthwash. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 774, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.09.001>
- Daniel, B., Konrad, B., Toplak, M., Lahham, M., Messenlehner, J., Winkler, A., & Macheroux, P. (2017). The family of berberine bridge enzyme-like enzymes: A treasure-trove of oxidative reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 632, 88-103. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.06.023>

-
- Färber, K., Schumann, B., Miersch, O., & Roos, W. (2003). Selective desensitization of jasmonate-and pH-dependent signaling in the induction of benzophenanthridine biosynthesis in cells of *Eschscholzia californica*. *Phytochemistry*, 62(3), 491-500. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00562-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00562-9)
 - Fossati, E., Ekins, A., Narcross, L., Zhu, Y., Falgoutyret, J. P., Beaudoin, G. A., ... & Martin, V. J. (2014). Reconstitution of a 10-gene pathway for synthesis of the plant alkaloid dihydrosanguinarine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature communications*, 5(1), 3283. <https://doi.org/10.1038/ncomms4283>
 - Fu, C., Guan, G., & Wang, H. (2018). The anticancer effect of sanguinarine: A review. *Current Pharmaceutical Design*, 24(24), 2760-2764. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612824666180829100601>
 - Fu, Y., Liu, W., Liu, M., Zhang, J., Yang, M., Wang, T., & Qian, W. (2021). *In vitro* anti-biofilm efficacy of sanguinarine against carbapenem-resistant *Serratia marcescens*. *Biofouling*, 37(3), 341-351. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1919649>
 - Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., & Thayyullathil, F. (2017). Molecular targets and anticancer potential of sanguinarine—A benzophenanthridine alkaloid. *Phytomedicine*, 34, 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.08.006>
 - Glasa, M., Šoltys, K., Predajňa, L., Sihelská, N., Nováková, S., Šubr, Z., ... & Mihálik, D. (2018). Molecular and biological characterisation of turnip mosaic virus isolates infecting poppy (*Papaver somniferum* and *P. rhoeas*) in Slovakia. *Viruses*, 10(8), 430. <https://doi.org/10.3390/v10080430>
 - Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 54(5), 647-672. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct020>
 - Hagel, J. M., Mandal, R., Han, B., Han, J., Dinsmore, D. R., Borchers, C. H., ... & Facchini, P. J. (2015). Metabolome analysis of 20 taxonomically related benzylisoquinoline alkaloid-producing plants. *BMC plant biology*, 15(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0596-0>
 - Han, N., Yang, Z., Liu, Z., Liu, H., & Yin, J. (2016). Research progress on natural benzophenanthridine alkaloids and their pharmacological functions: A review. *Natural product communications*, 11(8), <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100838>
 - Khan, A. Q., Rashid, K., AlAmodi, A. A., Agha, M. V., Akhtar, S., Hakeem, I., ... & Uddin, S. (2021). Reactive oxygen species (ROS) in cancer pathogenesis and therapy: An update on the role of ROS in anticancer action of benzophenanthridine alkaloids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112142. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112142>
 - Leger, E. A., & Forister, M. L. (2005). Increased resistance to generalist herbivores in invasive populations of the California poppy (*Eschscholzia californica*). *Diversity and Distributions*, 11(4), 311-317. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2005.00165.x>
-

-
- Liao, D., Wang, P., Jia, C., Sun, P., Qi, J., Zhou, L., & Li, X. E. (2016). Identification and developmental expression profiling of putative alkaloid biosynthetic genes in *Corydalis yanhusuo* bulbs. *Scientific Reports*, 6(1), 19460. <https://doi.org/10.1038/srep19460>
 - Liscombe, D. K., MacLeod, B. P., Loukanina, N., Nandi, O. I., & Facchini, P. J. (2005). Evidence for the monophyletic evolution of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry*, 66(11), 1374-1393. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.029>
 - Liu, X., Liu, Y., Huang, P., Ma, Y., Qing, Z., Tang, Q., ... & Zeng, J. (2017). The genome of medicinal plant *Macleaya cordata* provides new insights into benzyloisoquinoline alkaloids metabolism. *Molecular plant*, 10(7), 975-989. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.05.007>
 - Mingorance, J., Rivas, G., Velez, M., Gomez-Puertas, P., & Vicente, M. (2010). Strong FtsZ is with the force: mechanisms to constrict bacteria. *Trends in microbiology*, 18(8), 348-356. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.06.001>
 - Nwanyichukwu, P. (2014). Identification and characterization of an adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporter EcABCB1 involved in the transport of alkaloids in *Eschscholzia californica* (Doctoral dissertation, University of Calgary).
 - O'Neill, N. R., Jennings, J. C., Bailey, B. A., & Farr, D. F. (2000). *Dendryphion penicillatum* and *Pleospora papaveracea*, destructive seedborne pathogens and potential mycoherbicides for *Papaver somniferum*. *Phytopathology*, 90(7), 691-698. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.7.691>
 - Park, M. J., Cho, S. E., Piątek, M., & Shin, H. D. (2012). First report of powdery mildew caused by *Erysiphe macleayae* on *Macleaya microcarpa* in Poland. *Plant Disease*, 96(9), 1376-1376. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0244-PDN>
 - Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., ... & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: The bright side of the moon. *Experimental & molecular medicine*, 52(2), 192-203. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>
 - Reed, J. W., & Hudlicky, T. (2015). The quest for a practical synthesis of morphine alkaloids and their derivatives by chemoenzymatic methods. *Accounts of chemical research*, 48(3), 674-687. <https://doi.org/10.1021/ar500427k>
 - Rolland, A., Fleurentin, J., Lanhers, M. C., Younos, C., Misslin, R., Mortier, F., & Pelt, J. M. (1991). Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. *Planta medica*, 57(03), 212-216. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960076>
 - Roos, W., Viehweger, K., Dordschbal, B., Schumann, B., Evers, S., Steighardt, J., & Schwartze, W. (2006). Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways—the case of *Eschscholzia californica*. *Journal of plant physiology*, 163(3), 369-381. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.012>
-

-
- Saeed, M. E., Mahmoud, N., Sugimoto, Y., Efferth, T., & Abdel-Aziz, H. (2018). Molecular determinants of sensitivity or resistance of cancer cells toward sanguinarine. *Frontiers in pharmacology*, 9, 136. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00136>
 - Salmore, A.K.; Hunter, M.D. (2001). Elevational trends in defense chemistry, vegetation, and reproduction in *Sanguinaria canadensis*. *J. Chem. Ecol.* 27, 1713–1727. <https://doi.org/10.1023/A:1010411122739>
 - Schmeller, T., Latz-Brüning, B., & Wink, M. (1997). Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*, 44(2), 257-266. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00545-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00545-6)
 - Singh, A., Menéndez-Perdomo, I. M., & Facchini, P. J. (2019). Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy: an update. *Phytochemistry Reviews*, 18, 1457-1482. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09644-w>
 - Takemura, T., Ikezawa, N., Iwasa, K., & Sato, F. (2013). Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 in sanguinarine biosynthesis from *Eschscholzia californica* cells. *Phytochemistry*, 91, 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.013>
 - Tang, J., Lebas, B., Liefting, L., Veerakone, S., Wei, T., & Ward, L. (2016). Opium poppy mosaic virus, a new umbravirus isolated from *Papaver somniferum* in New Zealand. *Archives of virology*, 161, 197-201. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2651-4>
 - Vázquez-Flota, F. A., & Loyola-Vargas, V. M. (2003). In vitro plant cell culture as the basis for the development of a Research Institute in México: Centro de Investigación Científica de Yucatán. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39, 250-258. <https://doi.org/10.1079/IVP2002398>
 - Verma, P., Khan, S. A., Mathur, A. K., Ghosh, S., Shanker, K., & Kalra, A. (2014). Improved sanguinarine production via biotic and abiotic elicitations and precursor feeding in cell suspensions of latex-less variety of *Papaver somniferum* with their gene expression studies and upscaling in bioreactor. *Protoplasma*, 251, 1359-1371. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0638-8>
 - Wang, L., Wang, X., Wang, W., Liu, W., Liu, Y., Xie, H., ... & Cheng, P. (2021). Visible-light-promoted biomimetic reductive functionalization of quaternary benzophenanthridine alkaloids. *Journal of Natural Products*, 84(8), 2390-2397. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00512>
 - Wang, Q., Zhao, Z., Shang, J., & Xia, W. (2014). Targets and candidate agents for type 2 diabetes treatment with computational bioinformatics approach. *Journal of Diabetes Research*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/763936>
 - Watts, S. M., Dodson, C. D., & Reichman, O. J. (2011). The roots of defense: plant resistance and tolerance to belowground herbivory. *Plos One*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018463>
-

-
- Wink, M., Schmeller, T., & Latz-Brüning, B. (1998). Modes of action of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. *Journal of chemical Ecology*, 24, 1881-1937. <https://doi.org/10.1023/A:1022315802264>
 - Yamada, Y., Hirakawa, H., Hori, K., Minakuchi, Y., Toyoda, A., Shitan, N., & Sato, F. (2021). Comparative analysis using the draft genome sequence of California poppy (*Eschscholzia californica*) for exploring the candidate genes involved in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 85(4), 851-859. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbaa091>
 - Yamada, Y., Motomura, Y., & Sato, F. (2015). CjbHLH1 homologs regulate sanguinarine biosynthesis in *Eschscholzia californica* cells. *Plant and Cell Physiology*, 56(5), 1019-1030. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv027>
 - Yamada, Y., Shimada, T., Motomura, Y., & Sato, F. (2017). Modulation of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis by heterologous expression of CjWRKY1 in *Eschscholzia californica* cells. *Plos One*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186953>
 - Yang, R., Gao, Z. F., Zhao, J. Y., Li, W. B., Zhou, L., & Miao, F. (2015). New class of 2-Aryl-6-chloro-3, 4-dihydroisoquinolinium salts as potential antifungal agents for plant protection: Synthesis, bioactivity and structure–activity relationships. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(7), 1906-1914. <https://doi.org/10.1021/jf505609z>
 - Yang, X. J., Miao, F., Yao, Y., Cao, F. J., Yang, R., Ma, Y. N., ... & Zhou, L. (2012). In vitro antifungal activity of sanguinarine and chelerythrine derivatives against phytopathogenic fungi. *Molecules*, 17(11), 13026-13035. <https://doi.org/10.3390/molecules171113026>
 - Yu, X., Gao, X., Zhu, Z., Cao, Y., Zhang, Q., Tu, P., & Chai, X. (2014). Alkaloids from the tribe Bocconieae (Papaveraceae): A chemical and biological review. *Molecules*, 19(9), 13042-13060. <https://doi.org/10.3390/molecules190913042>
 - Zhang, J., He, S., Wang, J., Wang, C., Wu, J., Wang, W., ... & Li, F. (2020). A Review of the traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology of *Corydalis yanhusuo*. *Natural Product Communications*, 15(9), 1934578X20957752. <https://doi.org/10.1177/1934578X20957752>
 - Zhang, Q., Lyu, Y., Huang, J., Zhang, X., Yu, N., Wen, Z., & Chen, S. (2020). Antibacterial activity and mechanism of sanguinarine against *Providencia rettgeri* In vitro. *PeerJ*, 8, e9543. <https://doi.org/10.7717/peerj.9543>
 - Zhao, Z. M., Shang, X. F., Lawoe, R. K., Liu, Y. Q., Zhou, R., Sun, Y., ... & Yang, C. J. (2019). Anti-phytopathogenic activity and the possible mechanisms of action of isoquinoline alkaloid sanguinarine. *Pesticide biochemistry and physiology*, 159, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.015>
 - Zhong, J. (2021). Sanguinarine Ameliorates Diabetic Nephropathy in Rats through Nuclear Factor-Kappa B and Nuclear-Factor Erythroid 2-Related Factor 2/Heme Oxygenase-1
-

Pathways. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 19(4). <https://doi.org/10.37290/ctnr2641-452X.19:398-404>

- Zhou, L., Huang, P., Yu, L., & Zeng, J. (2020). First report of root rot caused by *Fusarium oxysporum* on *Macleaya cordata* in China. *Journal of Plant Pathology*, 102, 191-192. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00382-8>
- Zielińska, S., Jezierska-Domaradzka, A., Wójciak-Kosior, M., Sowa, I., Junka, A., & Matkowski, A. M. (2018). Greater Celandine's ups and downs– 21 centuries of medicinal uses of *Chelidonium majus* from the viewpoint of today's pharmacology. *Frontiers in pharmacology*, 9, 299. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00299>