

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
CAPITULO I. ANTECEDENTES	4
I.1. Sistema <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /pásmido Ti	5
I.2. Clasificación de las opinas	7
I.3. Síntesis de las opinas	8
I.4. Estructura y función del ADN-T	8
I.5. Transferencia del ADN-T a la planta	10
I.6. Biosíntesis de los alcaloides de <i>Catharanthus roseus</i>	11
I.6.1. Enzimas	12
I.6.2.Regulación	12
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	13
DISEÑO EXPERIMENTAL	14
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS	26
II.1. Material Biológico	26
II.2. Métodos	26
II.2.1. Cultivo de tejidos	27
II.2.2. Determinaciones enzimáticas	27
II.2.2.1. Obtención del extracto enzimático	27

NADH	II.2.2.2. Determinación de la actividad de la glutamato deshidrogenasa	27
NAD ⁺	II.2.2.3. Determinación de la actividad de la glutamato deshidrogenasa	28
	II.2.2.4. Determinación de la actividad de la glutamino sintetasa	28
	II.2.2.5. Determinación de la actividad de la glutamato sintasa NADH	29
	II.2.3. Determinación de proteína soluble	30
	II.2.4. Determinación de la liberación de oxígeno	31
	II.2.4.1. Ajuste del oxígrafo	31
	II.2.4.2. Medición de las tasas de liberación de oxígeno	32
	II.2.5. Análisis de los alcaloides	33
	II.2.5.1. Extracción y cuantificación de los alcaloides totales	33
	II.2.5.2. Cromatografía de capa fina	33
	II.2.5.3. Cromatografía líquida de alta resolución	34
	II.2.5.4. Reducción de serpentina a ajmalicina	34
	II.2.5.5. Cuantificación de serpentina	34
	II.2.5.6. Cuantificación de ajmalicina	35
	II.2.6. Purificación de los alcaloides	35
	II.2.6.1. Caracterización de las fracciones	35

II.2.6.2. Espectros de ultravioleta	36
II.2.6.3. Espectrometría de masas	36
II.2.7. Cuantificación de la clorofila total	36
II.2.8. Detección de las opinas	36
II.2.8.1. Obtención del extracto	36
II.2.8.2. Método de detección	37
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION	47
III.1. Caracterización de los alcaloides	47
III.1.1. Metodología para la extracción de los alcaloides	47
III.1.2. Caracterización y análisis de los alcaloides de las líneas tumorales de <i>Catharanthus roseus</i>	48
III.1.2.1. Patrones de crecimiento y contenido de alcaloides de las líneas tumorales	48
III.1.2.2. Evidencias acerca de la presencia de serpentina en las líneas tumorales	49
III.1.2.3. Purificación de los alcaloides	50
III.1.2.4. Corrida de los estándares	50
III.1.2.5. Aplicación del extracto	51
III.1.2.6. Elución de la columna	51
III.1.2.7. Caracterización de las fracciones	51
III.1.2.8. Cuantificación de los alcaloides totales de las líneas tumorales LBA 1 (silvestre) y LBA 4210 (cit) a lo largo del ciclo de cultivo	53

III.1.2.9. Cuantificación de serpentina y de ajmalicina en las líneas tumorales LBA 1 (silvestre) y LBA 4210 (cit)	53
III.1.2.10. Enverdecimiento de la línea tumoral LBA 4210 (cit, blanca) y de cultivos normales de <i>Catharanthus roseus</i>	54
III.1.2.11. Efecto de la fuente nitrogenada sobre el contenido de alcaloides totales, serpentina y ajmalicina, de la línea tumoral LBA 1 (silvestre)	55
III.2. Caracterización de la transformación	57
III.2.1. Detección de las opinas	57
III.3. Conclusiones	57
III.3. Importancia biotecnológica	58
BIBLIOGRAFIA	106

RESUMEN.

La planta *Catharanthus roseus* produce una gran variedad de alcaloides indólicos muchos de los cuales son usados en el tratamiento de diferentes enfermedades entre las que se encuentran el cáncer y la hipertensión. El aislamiento de estos compuestos es muy costoso, ya que la planta los produce en concentraciones extremadamente bajas; precisamente por esta razón varios grupos en el mundo están utilizando a *C. roseus* como modelo experimental para el estudio de la obtención de alcaloides derivados del indol, por técnicas de cultivo de tejidos vegetales, y nuestro grupo es uno de ellos. En este trabajo se presenta la caracterización de 4 líneas tumorales: 2 provenientes de cepas silvestres de *Agrobacterium tumefaciens* y 1 proveniente de una cepa mutante (arg), las cuales son verdes, y otra línea proveniente de una cepa mutante (cit) la cual es blanca, aún cuando se cultiva en presencia de luz. Los alcaloides totales y el patrón de alcaloides fue diferente en las líneas verdes y en la línea blanca, así como en una misma línea a lo largo del ciclo de cultivo (24 días); siendo la principal diferencia la presencia de serpentina en las líneas verdes. Cuando células normales de *C. roseus* son crecidas en la oscuridad y en presencia de 3 mg/l de benziladenina son de color blanco y no está presente serpentina, pero cuando estos cultivos se transfieren a la luz, se vuelven verdes y su contenido de clorofila alcanza hasta 150 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco (PF) después de 24 días. De manera paralela, el contenido de serpentina se incrementa por encima de 3.1 mg/g de peso seco (PS). Por otro lado, células tumorales de la línea LBA 4210 obtenidas de una cepa mutante (cit) de *A. tumefaciens* son también blancas y no producen serpentina aún cuando crecen en la luz. Cuando este tejido tumoral se transfiere a un medio que contiene benziladenina (3 mg/l), se vuelven verdes, el contenido de clorofila alcanza 54 $\mu\text{g/g}$ PF después de 204 días en presencia de la citocinina, y el contenido de serpentina alcanza 0.3 mg/g PS. Esto sugiere una función fundamental de los cloroplastos en la biosíntesis de serpentina. Por otro lado se investigó el efecto de la fuente nitrogenada sobre el contenido y la naturaleza de los alcaloides presentes en los tumores de la línea LBA 1 de *C. roseus*; los tumores fueron cultivados en medio basal PC con 3 diferentes fuentes nitrogenadas. Al transferir a los cultivos al medio que contenía nitrato como única fuente se produjo un aumento de hasta 2.8 veces en el contenido de alcaloides totales en los primeros 4 días del ciclo de cultivo, el contenido de serpentina siguió un comportamiento muy similar al del control hasta el día 16 del cultivo, el contenido de serpentina disminuyó, marcadamente, hasta desaparecer de los tumores, después de 12 días en presencia de amonio y se observó una inhibición en la acumulación de ajmalicina. Se discute la factibilidad biotecnológica de utilizar esta metodología.