

CONTENIDO

Introducción	1
CAPITULO I	3
ANTECEDENTES	3
I.1. Descripción genérica de <i>Catharanthus roseus</i>	3
I.2. Aplicaciones clínicas e importancia de los alcaloides indólicos	4
I.3. Biosíntesis, Compartimentalización y Regulación de los alcaloides de <i>Catharanthus roseus</i>	8
I.4. Inducción del metabolismo secundario	8
I.4.1. Tipos de inducción	9
I.4.2. Mecanismos de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos	10
I.4.2.1. Fitoalexinas	10
I.4.2.2. Radicales Libres	12
I.4.2.3. Barreras Físicas	12
I.4.2.4. Otros mecanismos de defensa	13
I.4.3. Estructura de los inductores	13
I.4.4. Forma de liberación de los inductores	15
I.4.5. Alteraciones estimuladas por los inductores	16
I.4.6. Evidencias a favor de un mecanismo de transducción de señales mediador del fenómeno de la inducción	18
I.5. El sistema de la adenilato ciclasa-AMPc	20
I.5.1. Adenilato ciclasa	22
I.5.2. Proteínas G	23
I.5.3. Fosfodiesterasa	24
I.5.4. Proteína cinasa dependiente de AMPc	25
I.5.5. Papel del AMPc en los procesos fisiológicos de las plantas	26
I.5.5.1. AMPc como mensajero secundario	26
I.5.5.2. AMPc como mensajero primario	27

I.6. Sistema fosfoinosítidos-calcio	28
I.6.1. Fosfoinosítidos como mensajeros secundarios en plantas	28
I.6.2. Diacilglicerol como mensajero secundario en plantas	31
I.6.3. Ca^{+2} como mensajero secundario en plantas	32
I.6.4. Calmodulina en plantas	33
I.6.5. Enzimas dependientes de calcio en plantas	34
I.6.6. Participación del calcio en los procesos fisiológicos de plantas	35
CAPITULO II	36
MATERIALES Y METODOS	36
II.1. Hipótesis	36
II.2. Diseño experimental	37
II.3. Descripción de las técnicas analíticas	38
II.3.1. Mantenimiento del cultivo	38
II.3.2. Cultivo y preparación del homogenado fúngico	38
II.3.3. Tratamiento de inducción del cultivo de células en suspensión	38
II.3.4. Extracción y cuantificación de alcaloides	40
II.3.5. Determinación de fenoles	41
II.3.6. Determinación de furanocumarinas	41
II.3.7. Determinación de azúcares solubles totales	42
II.3.8. Obtención y purificación de protoplastos	42
II.3.9. ADP-ribosilación	43
II.3.9.1. Activación de la toxina	44
II.3.9.2. Electroforesis	44
II.3.10. Inmunoprecipitación de las proteínas	44
II.3.10.1. Preparación de la suspensión de proteína A sepharosa	45
II.3.11. Inmunotransferencia (Western blot)	45
II.3.12. Determinación de adenilato ciclase	47
II.3.12.1. Calculo del porcentaje de recuperación de las columnas y de la actividad específica de adenilato ciclase	48

II.3.13. Determinación de proteínas	49
CAPITULO III	51
RESULTADOS Y DISCUSION	51
III.1. Selección de la línea celular y del homogenado fúngico	51
III.2. Caracterización de la línea celular CrS1	55
III.3. Optimización de la concentración del inductor y de la fase de crecimiento del cultivo celular	56
III.4. Optimización de la edad de cultivo de <i>Aspergillus fumigatus</i>	60
III.5. Curso temporal de la inducción	62
III.6. Inducción del metabolismo secundario de la línea CrS1 mediante otras estrategias	63
III.6.1. Inducción con vanadato	64
III.6.2. Inducción con ácido trans-cinámico	66
III.7. Estudio del efecto de diferentes moduladores de los mecanismos de transducción de señales y su implicación en la respuesta de inducción en la línea celular CrS1	68
III.7.1. Moduladores del mecanismo mediado por AMPc	69
III.7.1.1. Efecto de la adición de forskolina	69
III.7.1.2. Efecto de la adición de GppNHp	70
III.7.1.3. Efecto de la adición de toxina del cólera	72
III.7.2. Moduladores del mecanismo mediado por Ca^{+2}	75
III.7.2.1. Efecto de la adición del ionoforo de Ca^{+2} , A23187	75
III.7.2.2. Efecto de la adición de EGTA	78
III.7.2.3. Efecto de la adición de verapamil	79
III.8. Detección de proteínas G y de adenilato ciclase, dos componentes del mecanismo mediado por AMPc	84
CAPITULO IV	90
CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFIA	91