



---

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN  
FACULTAD DE QUIMICA

" PURIFICACION PARCIAL DE LA ESTRICOTOSIDINA SINTASA EN  
CULTIVOS DE RAICES TRANSFORMADAS DE Catharanthus roseus "

T E S I S

PRESENTADA POR:

*Jose Armando Muñoz Sanchez*

EN SU EXAMEN PROFESIONAL  
EN OPCION AL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

BIBLIOTECA CICY

MERIDA, YUCATAN, MEXICO  
1995

# INDICE

	PAG.
RESUMEN	
INTRODUCCION .....	1
CAPITULO I.....	5
ANTECEDENTES.....	6
I.1.Generalidades.....	6
I.2.Metabolismo.....	7
I.3.Biotecnología.....	11
I.4. Modelo.....	12
I.5. Cultivo de tejidos.....	13
I.6. Cultivo de raíces.....	14
I.7. Biosíntesis de los alcaloides indólicos.....	16
I.7.1. Triptofano descarboxilasa.....	21
I.7.2. Geraniol-10-hidroxilasa .....	22
I.7.3. Estrictosidina sintasa.....	22
CAPITULO II.....	29
JUSTIFICACION.....	30
OBJETIVOS .....	31
CAPITULO III.....	32
MATERIALES Y METODOS.....	33
III.1. Diseño experimental.....	33
III.2. Material biológico y mantenimiento.....	33
III.3. Caracterización durante el crecimiento.....	33
III.3.1. pH.....	33
III.3.2. Peso fresco.....	34
III.3.3. Conductividad.....	34
III.3.4. Determinación de las proteínas .....	34

III.3.5. Evaluación de la actividad de estrictosidina sintasa durante un ciclo de cultivo.....	35
III.4. Protocolo de purificación.....	37
III.4.1. Extracción.....	37
III.4.2. Métodos de concentración.....	39
III.4.2.1. Concentración con resina Sephadex G-25.....	39
III.4.2.2. Concentración con un equipo de amicon.....	39
III.4.2.3. Desalado en cromatografía de columna (G-25).....	40
III.4.3. Cromatografía de capa delgada (CCD).....	40
III.4.4. Cromatografía de columna .....	41
III.4.4.1. Columna de intercambio iónico.....	41
III.4.4.2. Columna de permeación en gel.....	43
III.5. Métodos para la cuantificación de la actividad de SS.....	46
III.5.1. Método A ( Formación de <sup>14</sup> C-strictosidina) .....	46
III.5.2. Método B (Cuantificación de estrictosidina mediante HPLC).....	48
III.5.3. Método C (Cuantificación de <sup>14</sup> C-triptamina por CCD).....	48
III.5.4. Método D (Cuantificación de triptamina por HPLC).....	49
CAPITULO IV.....	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
IV.1. Métodos de cuantificación de la SS.....	51
IV.1.1. Formación de <sup>14</sup> C-strictosidina.....	51
IV.1.2. Cuantificación de estrictosidina mediante HPLC.....	51
IV.1.3. Cuantificación de <sup>14</sup> C-triptamina por CCD.....	57
IV.1.4. Cuantificación de triptamina por HPLC.....	59
IV.2. Caracterización de las raíces transformadas de <i>Catharanthus roseus</i> .....	62
IV.3. Actividad de la SS durante el ciclo de cultivo.....	64
IV.4. Método para concentrar el extracto.....	66
IV.5. Purificación de la SS .....	66
CAPITULO V .....	74
CONCLUSIONES .....	75
PERSPECTIVAS .....	76
BIBLIOGRAFIA .....	78

## RESUMEN

Las plantas cumplen muchas funciones indispensables para la vida en el planeta y, dentro de éstas se encuentra la producción de metabolitos secundarios, como por ejemplo, los alcaloides indólicos, que se producen en la planta *Catharanthus roseus* en una amplia gama la cual es una ventaja que el hombre trata de aprovechar a su máxima capacidad debido a las propiedades farmacológicas que presentan y a la importancia comercial de las mismas; éstos se derivan a través de mecanismos biosintéticos en rutas metabólicas parcialmente esclarecidas. Esta producción, se lleva a cabo de manera mayoritaria en tejidos especializados como son las raíces, las cuales son un órgano de la planta sobre el que se centra la pregunta principal del proyecto, ya que se busca su verdadera función en la planta. Para empezar a responder a esto es necesario purificar y caracterizar las enzimas claves que catalizan las reacciones en las rutas metabólicas de biosíntesis. Una de éstas enzimas involucradas es la estrictosidina sintasa (SS) que cataliza la reacción que produce a la estrictosidina, del cual se derivan varias vías para formar diferentes alcaloides indólicos terpénicos. Se hace uso de una herramienta biotecnológica importante y con firmes ventajas a nivel de laboratorio, como es el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, aplicándolo en este caso a un modelo de raíces transformadas de *C. roseus*. En este trabajo se caracterizó a una línea de raíces transformadas de *C. roseus* (línea J1) tomando como parámetros de crecimiento al peso fresco y la conductividad, además se midió el pH del medio

de cultivo durante un ciclo de crecimiento de 36 días. Se probaron diferentes métodos para cuantificar la actividad de la SS y, finalmente se estableció uno, el cual se basa en una medición de la formación de  $^{14}\text{C}$ -estrictosidina. También se estableció un protocolo de purificación para la SS en el cual se realizan etapas de extracción y concentración de la proteína, etapas de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de permeación en gel; todas éstas metodologías integradas a sistemas de FPLC y HPLC. Logrando después de esto visualizar la presencia de seis posibles isoenzimas y la purificación parcial de una ellas en un grado del 8.4% de enzima pura; avanzando de manera importante hacia adelante en la elucidación de las vías biosintéticas, pues con una metodología de purificación establecida se puede purificar completamente a la SS y, así contar con una herramienta poderosa para continuar con la producción de anticuerpos, la clonación y contribuir al conocimiento de la función de las raíces en la planta.