

# INDICE GENERAL

## RESUMEN INTRODUCCION

1

### Capítulo I

#### ANTECEDENTES

#### PAGINAS

|  |    |
|--|----|
| I.1- Productos naturales.                                  | 4  |
| I.2- Metabolismo primario y secundario.                    | 5  |
| I.3- Alcaloides.   | 6  |
| I.3.1- Alcaloides indólicos.                               | 9  |
| I.3.2- Inicio de la vía de los alcaloides indolicos.       | 12 |
| I.4- Conocimiento actual de la TDC.                        | 14 |
| I.5- Compartimentalización subcelular.                     | 16 |
| I.6- Electroforesis.                                       | 18 |
| I.6.1- Electroforesis en dos dimensiones.                  | 20 |
| I.7- Microscopía.  | 21 |
| I.7.1- Microscopía óptica y electrónica.                   | 21 |
| I.7.2- Microscopía de fluorescencia.                       | 23 |
| I.7.2.1- Fluorescencia.                                    | 23 |
| I.7.2.2- Fluorocromos.                                     | 26 |
| I.8- Anticuerpos.  | 27 |
| I.9- Inmunocitoquímica.                                    | 30 |
| I.10- Métodos inmunocitoquímicos empleados en microscopía. | 30 |

#### JUSTIFICACION

35

#### OBJETIVOS

36

### Capítulo II

#### DISEÑO EXPERIMENTAL MATERIALES Y METODOS

37

|  |    |
|--|----|
| II.1- Cultivo de raíces.                             | 38 |
| II.2- Extracción de proteínas.                       | 38 |
| II.3- Determinación de proteínas.                    | 39 |
| II.3.1- Método de Peterson.                          | 39 |
| II.3.2- Método de BCA.                               | 39 |
| II.4- Análisis electroforéticos.                     | 40 |
| II.5- Tinción con plata.                             | 40 |
| II.6- Tinción con coomassie.                         | 41 |
| II.7- Electroforesis en dos dimensiones.             | 41 |
| II.8- Electrotransferencia e inmunoblot.             | 42 |
| II.9- Revelado por quimioluminiscencia.              | 42 |
| II.10- Inclusión de tejidos para microscopía óptica. | 43 |

|  |    |
|--|----|
| II.10.1- Inmunocitocalización.   | 43 |
| II.11- Inclusión de tejidos para microscopía electrónica.              | 44 |
| II.11.1- Inmunocitocalización.   | 44 |
| II.12- Revelado de negativos.  | 45 |
| II.13- Impresión en papel.   | 45 |
| II.14- Determinación de la actividad de la TDC en un ciclo de cultivo. | 45 |
| II.15- Cuantificación de la actividad de la TDC.                       | 46 |

## **Capítulo III**

### **RESULTADOS**

|   |    |
|---|----|
| III.1- Análisis electroforético e inmunodetección.  | 48 |
| III.1.1- Electroforesis en una dimensión.           | 48 |
| III.1.1.1- Inmunodetección.                         | 51 |
| III.1.2- Electroforesis en dos dimensiones.         | 55 |
| III.1.2.1- Inmunodetección.                         | 57 |
| III.3- Inmunocitocalización.                        | 58 |
| III.3.1- Análisis histológico.                      | 58 |
| III.3.2- Análisis por microscopía de fluorescencia. | 59 |
| III.3.3- Análisis por microscopía electrónica.      | 63 |
| III.4- Actividad de la TDC en un ciclo de cultivo.  | 66 |

### **CONCLUSIONES**

68

### **BIBLIOGRAFIA**

69

## RESUMEN

La triptofano descarboxilasa (TDC) cataliza la conversión del triptofano a triptamina. Este compuesto está involucrado en la síntesis de la auxina ácido indolacético en las plantas, además de que es el precursor de la biosíntesis de los alcaloides indólicos monoterpénicos. Existen varios reportes que indican que la enzima se encuentra localizada en el citosol. En el presente trabajo se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia e inmunomarcaje con partículas de oro con el objetivo de inmunocito-localizar a la TDC en raíces transformadas de *Catharanthus roseus* línea J1, utilizando anticuerpos policlonales contra esta enzima. Mediante la técnica de inmunofluorescencia se observó que la TDC se localizó en la zona del meristemo, principalmente en la epidermis y en la región de la endodermis. En la zona de elongación, la enzima se localizó en la epidermis, mientras que en la zona de maduración no se observó fluorescencia asociada a la TDC. En el microscopio electrónico se observó marcaje asociado a la enzima en el citoplasma de la célula, además de que se observó que la TDC se localizó en el apoplasto y en la pared celular. Se aisló la región del apoplasto y se cuantificó la actividad enzimática de la TDC y se encontró que la enzima es activa en esta región celular. Su función en el apoplasto y en la pared no se conoce, por lo que es importante realizar estudios que nos ayuden a elucidar la posible función de la TDC en la región extracelular.