

ÍNDICE.GENERAL

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1

ANTECEDENTES

1. <i>CATHARANTHUS ROSEUS</i> (L) G. DON.	3
2. VIA METABÓLICA DE LOS ALCALOIDES EN <i>C. ROSEUS</i> .	5
3. BIOSÍNTESIS DE LA AJMALICINA Y LA SERPENTINA.	7
4. COMPARTAMENTALIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS ALCALOIDES	8
5. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.	12
6. CALCIO	15
6.1. DISTRIBUCIÓN Y FLUJO DE CALCIO EN SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN EN LA CÉLULA	16
6.2. REGULACIÓN DEL FLUJO DEL CALCIO CELULAR.	17
7. CALMODULINAS.	18
7.1. COMPOSICIÓN ESTRUCTURAL DE LAS CALMODULINAS.	19
7.2. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LAS CALMODULINAS.	19
8. PROTEÍNAS CINASAS.	19
8.1. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS CINASAS.	20
8.2. FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CINASAS.	21
8.3. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CINASAS.	22
8.3.1. GRUPO AGC.	22
8.3.2. GRUPO CaMK.	22
8.3.3. GRUPO CMGC.	22
8.3.4. GRUPO CONVENCIONAL PROTEÍNA TIROSINA CINASA	23
8.3.5. OTROS GRUPOS.	23
9. PROTEÍNAS CINASAS DEPENDIENTES DE CALCIO.	23
9.1. COMPOSICIÓN MOLECULAR Y TAMAÑO.	24
9.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y FISIOLÓGICA.	24
10. PROTEÍNAS CINASAS DEPENDIENTES DEL COMPLEJO CALCIO-CALMODULINA.	25
HIPÓTESIS.	26
OBJETIVOS.	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	27
MATERIALES Y MÉTODOS.	28
A. MATERIALES.	28
1. CULTIVO CELULAR.	28

2. REACTIVOS.	28
B. MÉTODOS.	29
1. TRATAMIENTO CON LOS FÁRMACOS.	29
1.1. DOSIS-RESPUESTA CON ANTAGONISTAS DE CALCIO.	30
1. 1. 1. VERAPAMIL.	30
1. 1. 2. EGTA.	32
1. 1. 3. TAPSIGARGINA.	32
1. 1. 4. TMB-8.	32
1. 2. DOSIS-RESPUESTA CON ANTAGONISTAS DE CALMODULINAS.	33
1. 2. 1. W-7	33
1. 2. 2. CALMIDAZOLIO.	33
1. 3. DOSIS-RESPUESTA CON ANTAGONISTAS DE PROTEÍNAS CINASAS.	33
1. 3. 1. ESTAUROSPORINA.	33
1. 3. 2. H-7.	33
1.3.3. PMA.	34
2. EXTRACCIÓN DE LOS ALCALOIDES TOTALES.	34
3. CUANTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES TOTALES.	35
4. CUANTIFICACIÓN DE LA SERPENTINA.	35
LISTADO DE LOS TRATAMIENTOS CON LOS FÁRMACOS	37
RESULTADOS.	38
1. TRATAMIENTO CON COMPUESTOS QUE MODIFICAN EL FLUJO EXTERNO DE CALCIO	38
2. TRATAMIENTO CON COMPUESTOS QUE MODIFICAN EL FLUJO INTERNO DE CALCIO.	41
3. TRATAMIENTO CON ACTIVADORES E INHIBIDORES DE PROTEÍNAS CINASAS.	43
4. TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DEL COMPLEJO Ca^{2+} -CALMODULINA	47
CONCLUSIONES.	50
BIBLIOGRAFÍA.	51

RESUMEN.

Las plantas producen una gran cantidad de alcaloides, muchos de los cuales se acumulan en las raíces; sin embargo, no se conoce con precisión en que tejido o en que compartimento celular se llevan a cabo las diferentes etapas de su biosíntesis. Se ha sugerido que algunas de ellas se realizan en el citoplasma, en tanto que otras se llevan a cabo en vesículas o plástidos. Tampoco se ha establecido claramente cual es el mecanismo de transporte intracelular de los alcaloides. En el proceso de secreción celular participan vacuolas o vesículas, las cuales pueden fusionarse con otras vacuolas, o con vesículas o migrar al plasmalema, liberando su contenido al medio extracelular. Estos procesos de secreción celular, así como la fusión de vesículas a la membrana plasmática involucran a un grupo de proteínas y de mensajeros intercelulares como el calcio y la calmodulina, las cinasas y las fosfolipasas, entre otros.

La serpentina es un alcaloide indólico producido por *Catharanthus roseus* a partir de la ajmalicina y que presenta importante actividad farmacológica. En el presente trabajo se realizaron estudios en una línea de raíces transformadas de *Catharanthus roseus* (LM2) que es altamente productora de este alcaloide, la cual se utilizó como modelo para investigar la posible participación del calcio, la calmodulina y las proteínas cinasas, en la regulación y biosíntesis de serpentina en raíces, así como su liberación al medio de cultivo. Se realizaron tratamientos de dosis-respuesta con fármacos que modifican el flujo externo e interno del calcio, con activadores e inhibidores de las proteínas cinasas y compuestos que inhiben la activación de las calmodulinas. La adición de diferentes concentraciones de estos compuestos a los cultivos de raíces transformadas de *C. roseus* provocó variaciones en la acumulación de este alcaloide en las raíces y en el medio de cultivo, lo que

indica que estos mensajeros intracelulares podrían estar regulando la biosíntesis de la serpentina en las raíces transformadas, así como su liberación al medio extracelular.