

2 E. No. 36



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE
EL METABOLISMO NITROGENADO Y EL CONTENIDO DE
ALCALOIDES DE CATHARANTHUS ROSEUS.**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

p r e s e n t a

IRENE GUADALUPE GOMEZ NORIEGA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

ABREVIATURAS	4
INTRODUCCION	5
I. ANTECEDENTES	9
II. MATERIALES Y METODOS	23
III. RESULTADOS Y DISCUSION	42
IV. CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFIA	71

A B R E V I A T U R A S

mM	mili-molar
NADH	nicotín-adenín-dinucleótido reducido
NAD ⁺	nicotín-adenín-dinucleótido oxidado
NADPH	nicotín-adenín-dinucleótido-fosforilado reducido
NADP ⁺	nicotín-adenín-dinucleótido-fosforilado oxidado
ATP	trifosfato de adenosina
NR	nitrate reductasa
NR	nitrite reductasa
GDH	glutamato deshidrogenasa
GS	glutamino sintetasa
GOGAT	glutamato sintasa
Glu	glutamato
Gln	glutamina
Fd	ferredoxina
VCR	vincristina
VLB	vincoleucoblastina
α KG	2-oxoglutarato

I N T R O D U C C I O N

La búsqueda de sustancias anticarcinogénicas ha sido una de las principales preocupaciones de la medicina, la farmacología y la bioquímica modernas.

Entre las sustancias que presentan esta característica se encuentran algunos alcaloides naturales como la vincristina y la vincoleucoblastina sintetizadas por las plantas del género Catharanthus. La obtención industrial de estos compuestos es muy costosa mas su efectividad en procesos curativos la justifica.

Catharanthus es una planta angiosperma, dicotiledónea que presenta las siguientes especies:

- a) Catharanthus roseus - presenta flores rosas.
- b) Catharanthus albus - presenta flores blancas.
- c) Catharanthus acellatus - presenta flores blancas con un círculo púrpura.

El género Vinca fue establecido por Linneo en el año 1753 en su trabajo Species Plantarum en donde distingue dos especies: V. mayor y V. minor. Sin embargo, ha recibido los siguientes nombres científicos: Lochnera rosea, Catharanthus roseus y Amocallis rosea.

En agosto de 1883 Ludwig Reichenbach le dió el nombre genérico de Lochnera, pero 5 meses antes George Don la había tipificado como Catharanthus, por lo que este nombre tiene prioridad. Su clasificación actual (75) es como sigue:

Familia: Apocinaceae
 Subfamilia: Plumerioideae
 Tribu: Alsotonieae
 Subtribu: Catharanthus G. Don

Los primeros compuestos aislados de la planta entera fueron la vincoleucoblastina y la leurosina (40), pero otras fracciones demostraron tener aún mayor actividad y posteriormente se encontraron la vincristina y la leurosidina. A la fecha se han reportado cerca de 130 alcaloides, comprendidos dentro de los tipos corynanthe, iboga, aspidosperma y strichnos, con patrones estructurales diferentes entre si (67).

Tanto vincristina como vincoleucoblastina pertenecen al tipo aspidosperma, que tiene como precedentes inmediatos a la vindolina y a la 16-betacarbometoxivelbanamina; alcaloides relativamente menores ya que su producción en la planta es de 1 g y 20 mg/ 1000 kg de peso fresco, respectivamente. Ambos han demostrado ser también agentes extremadamente valiosos en el tratamiento de enfermedades neoplásticas humanas, solos o en regímenes combinados.

El mecanismo de acción de estos alcaloides, se lleva a cabo inhibiendo la síntesis de los ácidos nucleicos, de las proteínas y de los lípidos; su efecto en la síntesis proteica está probablemente relacionado con su capacidad de unirse a los ribosomas y a sus subunidades, originando la precipitación de complejos en los ribosomas de las células afectadas.

Los alcaloides de vinca son también agentes inhibitorios específicos del ciclo celular, bloqueando la metafase en la mitosis; esta actividad biológica se explica por su capacidad de fijarse a la proteína tubulina, un componente clave de los microtúbulos celulares. La división celular en la metafase se interrumpe por disrupción de estos microtúbulos del aparato mitótico (12, 19, 60, 67).

Como se ha mencionado anteriormente, el bajo rendimiento para obtener los principios activos, ocasiona que los medicamentos elaborados con vincristina y vincoleucoblastina no sean de fácil acceso, ya que el tratamiento requiere de una dosis de 15-20 miligramos semanalmente (50, 66).

La hipótesis de este trabajo deriva de lo siguiente: estos alcaloides son derivados del indol, el cual deriva directamente del triptofano; este aminoácido tiene dos nitrógenos en su molécula; el del anillo indólico proviene del amido de la glutamina, en tanto que el α -amino se deriva del α -amino de la serina que a su vez lo hace del α -amino del glutamato (figura 1).

Todo lo anterior significa que los dos nitrógenos se derivan de amonio, lo que involucra directamente a las enzimas glutamino sintetasa y/o deshidrogenasa glutámica, por lo que la fuente nitrogenada podría influir en la biosíntesis de estos alcaloides.

De acuerdo a lo anterior, los objetivos de este trabajo son:

- 1.) Determinar el efecto de diferentes regímenes nutricionales de nitrógeno: amonio, nitrato y amonio más nitrato en el metabolismo nitrogenado, específicamente en la actividad de las siguientes enzimas:

GDH (deshidrogenasa glutámica)

GS (glutamino sintetasa)

GOGAT (glutamato sintasa)

- 2.) Determinar el efecto de diferentes fuentes nitrogenadas sobre el contenido total de alcaloides de Catharanthus roseus.

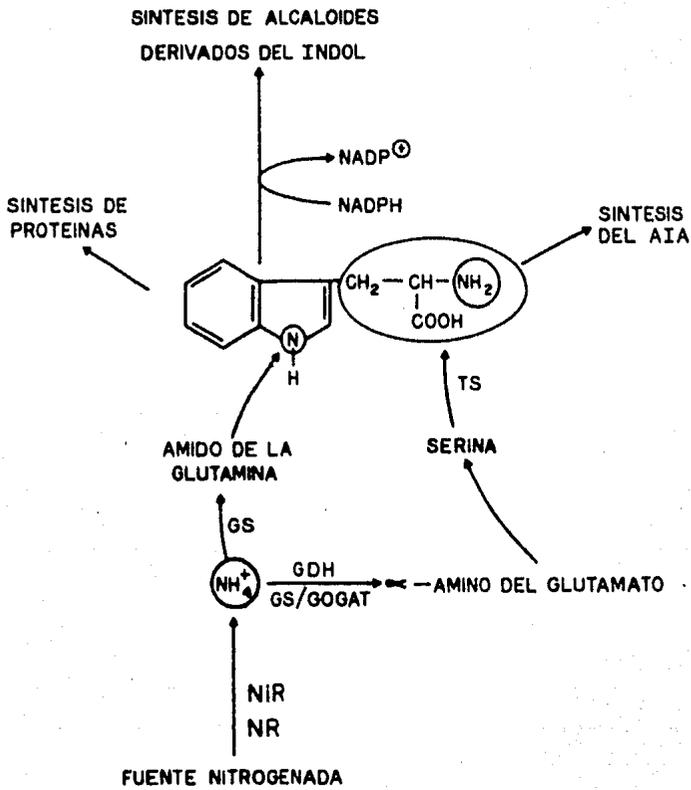


Figura 1. Hipótesis de trabajo

I ANTECEDENTES

I. METABOLISMO NITROGENADO

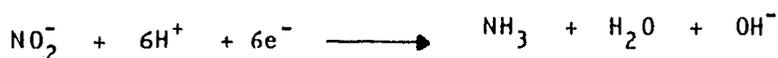
I.I.I ASPECTOS GENERALES

El nitrógeno es el elemento más abundante en los organismos vivos (con excepción del carbono, el hidrógeno y el oxígeno), y se encuentra en compuestos tan esenciales como las proteínas, los ácidos nucleícos, algunos de los reguladores del crecimiento de las plantas, las porfirinas y en muchas de las vitaminas (29).

El nitrógeno atmosférico es primero fijado por algunos microorganismos y convertido en nitrógeno inorgánico reducido (amonio), el cual puede ser oxidado por la flora del suelo hasta nitrato (29, 30). A este proceso de transformación del nitrógeno atmosférico en amonio se le denomina fijación del nitrógeno.

La reducción del nitrato a amonio se realiza en dos pasos catalizados por dos enzimas diferentes:

La conversión de nitrato a nitrito es catalizada por la nitrato reductasa (NR) y la reducción de nitrito a amonio por la nitrito reductasa (NiR).



La actividad de la NR está considerada como un paso limitante en la utilización del nitrato en las plantas (7, 51). Generalmente la NR en plantas superiores es menos sensible a la regulación por amonio, aunque se ha reportado en raíz de cebada (53), y raíz de algodón (47) una represión parcial.

El amonio resultante puede ser asimilado por dos vías diferentes:

- 1.- Vía glutamino sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT).
- 2.- Vía deshidrogenasa glutámica (GDH).

La primera vía asimila inicialmente al amonio en el amido de la glutamina en presencia de la GS, y a continuación la glutamina reacciona con el 2-oxoglutarato, en presencia de la GOGAT, para producir dos moléculas de glutamato (29, 36); mientras que la segunda vía produce directamente glutamato (36).

Una vez que el amonio se ha incorporado a una molécula orgánica, como grupo amino del ácido glutámico, es translocado a otras moléculas orgánicas para formar los demás aminoácidos mediante las enzimas denominadas transaminasas (29).
Figura I.1

I.I.2 VIA GDH

Según Harel, la NR y NiR están localizadas exclusivamente en las células del mesófilo en hojas de maíz y la GDH se encuentra en la membrana celular (16), por otra parte la GDH ha sido localizada principalmente en mitocondria (69), estando presente en la hoja en grandes cantidades.

Rhodes y colaboradores (49), han mostrado en experimentos con Lemna minor, que cuando hay concentraciones elevadas de amonio, la actividad de la GDH se incrementa. Más recientemente demostraron que la actividad de la GDH es inhibida por ATP, el cual es un sustrato para la GS y que el ADP y el 5'-AMP inhiben la actividad de la GS, mientras que sólo tiene un pequeño efecto sobre la GDH.

Estos resultados indicarían que la GS podría ser una enzima principal para la asimilación del amonio, cuando los cambios de energía son altos. Sin embargo, cuando el potencial fotosintético es bajo, los cambios de energía reducidos y los niveles de amonio altos, la GDH podría ser más importante en la asimilación del amonio (49).

- (1) Nitrogenasa
- (2) Nitrato reductasa
- (3) Nitrito reductasa
- (4) GOGAT
- (5) GDH
- (6) GS
- (7) Transaminasas

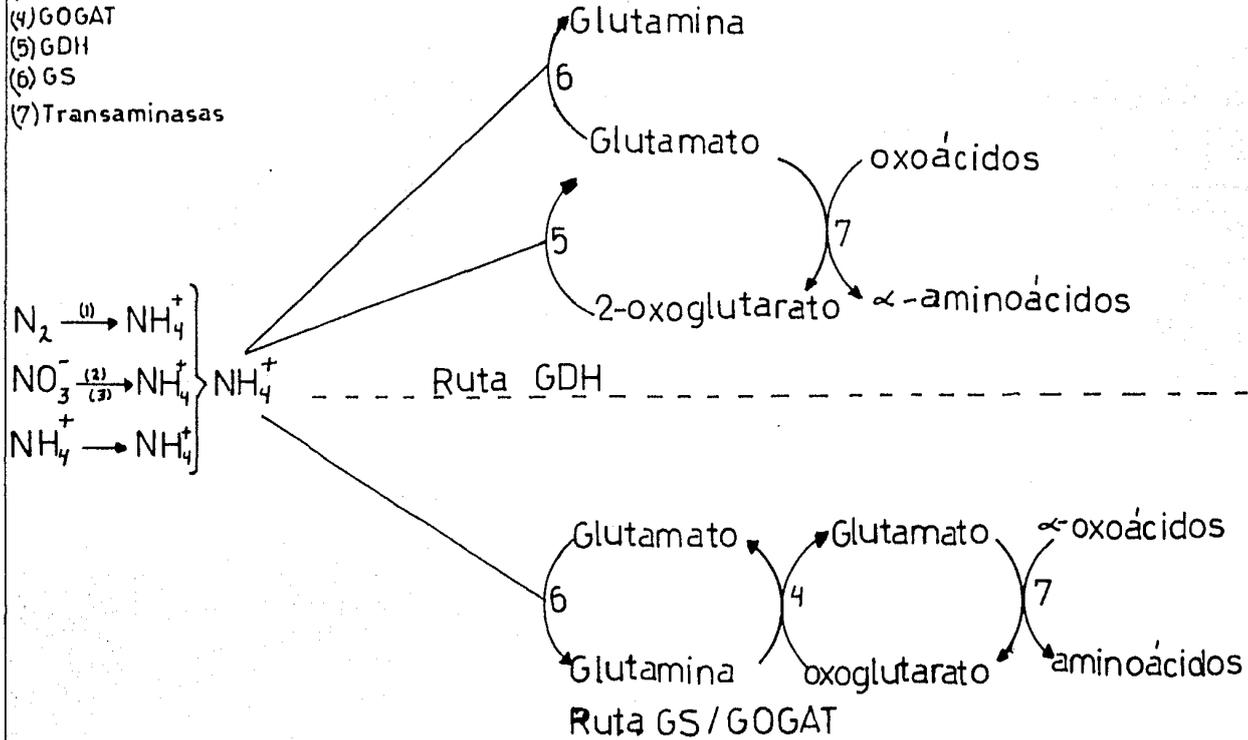


Figura 1.1 Ruta de asimilación del nitrógeno en plantas superiores (29).

Oaks y colaboradores (42), encontraron niveles altos de amonio y nitrato en células maduras de raíz de maíz y ésta podría ser la razón de que la actividad de la GDH se vea incrementada en estos sitios.

En levadura, la GDH es activa en la asimilación del amonio (36), y mutantes de E. coli (sin GS) pueden crecer en amonio, lo que indica que la GDH es activa. Así mismo, en raíces maduras de maíz la GDH es activa en la asimilación del NH_4^+ (42).

Canvin y Atkins encontraron muestras de que el $^{15}\text{NH}_3$ puede ser asimilado en la oscuridad y ellos sugieren que esto puede ocurrir fuera del cloroplasto vía GDH mitocondrial (8).

Naven y colaboradores (38), reportaron que la mitocondria vegetal esta adaptada para asimilar amonio, al menos cuando los niveles de amonio intracelular son elevados. Demostraron también, la participación de la GDH en la formación de glutamato bajo condiciones similares in vivo usando precursores marcados con ^{14}N .

Los iones también parecen tener una función regulatoria sobre la GDH; así, Oaks y colaboradores (42), reportaron que el Ca^{2+} mejora grandemente los niveles de GDH (31, 74), y que la actividad enzimática aminativa se ve inhibida por el EDTA (etilen-diamino-tetraacético), mientras que la desaminación oxidativa no se ve afectada (31, 61).

La existencia de diversas isoenzimas de la GDH ha llevado a proponer que éstas podrían tener una función relevante fisiológica en las plantas. Naven y colaboradores (38), han reportado evidencias de que las isoenzimas de la GDH están exclusivamente localizadas en la matriz mitocondrial de Pisum sativum.

Observaron que la GDH mitocondrial es sensible a cambios en los estados fisiológicos del tejido.

Yue (73), reporta siete isoenzimas de la GDH para maíz las cuales se encuentran en mitocondria, las cuales fueron dependientes de NAD^+ (72, 31).

Si bien aún no se encuentra claramente determinada la acción de la GDH en la asimilación del amonio, cada vez es más evidente que si tiene una función relevante durante dicho proceso (20, 31, 61).

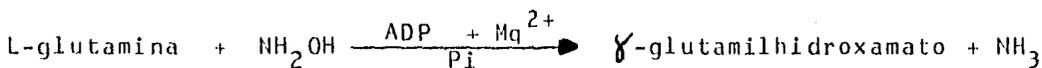
I.I.3 VIA GS/COGAT

La glutamino sintetasa cataliza la amidación de glutamato (22), por la siguiente reacción:



La GS es considerada la enzima responsable para la asimilación primaria del amonio en las plantas superiores. Esta enzima está presente en los cloroplastos, los cuales han sido propuestos como el mejor sitio para la síntesis de novo de los aminoácidos en las plantas superiores (52), así como en el citoplasma (18).

Cuando NH_3 es reemplazado por hidroxilamina (NH_2OH), en esta reacción, se forma el γ -glutamihidroxamato (45).



O'Neal y Joy (45), observaron que el mercaptoetanol y otros compuestos sulfhidrilo incrementaban la actividad de la enzima, en tanto que en presencia de acetato fenilmercúrico y ácido hidroximercúricofenilsulfónico la actividad de la GS en arroz fue inhibida en un 94 y 85 % respectivamente, sin embargo la enzima que fue inactivada por preincubación con acetato fenilmercúrico ó HgCl_2 fue reactivada por la adición de cisteína en un tiempo muy corto. Esto indica que la enzima posee grupos sulfhidrilo esenciales para su actividad (22).

Varner y Webster (64), sugirieron un mecanismo de reacción para la síntesis enzimática de la glutamina en Pisum sativum, lo cual implica:

- a) fosforilación de la enzima por ATP.
- b) reacción de la enzima-fosfato con glutamato para formar un complejo enzima-glutamato y finalmente,
- c) reacción del complejo enzima - glutamato con amonio o hidroxilamina para formar la amida o el hidroxamato.

Se ha encontrado que en cebada, hay una síntesis rápida de glutamina durante el período inicial de la asimilación del amonio y que la síntesis de novo del ácido glutámico a partir de ácido 2-oxoglutárico y amonio es necesaria para activar la síntesis de la glutamina (43).

Webster (71), determinó en preparaciones enzimáticas de tejidos de animales y en bacterias, que la glutamina puede ser formada directamente a partir de ácido glutámico y amonio, y que la energía para la síntesis es proporcionada por el ATP.

Poco se conoce, sin embargo, de las características de reacciones similares en plantas superiores.

Elliott (10), ha reportado la formación de ácido glutamil-hidroxámico en homogenados de plántulas de Lupinus en la presencia de glutamato, hidroxilamina, ATP y iones magnesio.

En 1975 Givan demostró que la síntesis de glutamina en la oscuridad ocurre sólo en presencia de ATP, y que la fotoconversión de glutamato a glutamina fue inhibida por concentraciones milimolares de amonio y nitrito. La síntesis de glutamina dependiente de ATP en la oscuridad no fue inhibida por iones amonio o nitrito (11).

La actividad de la GS es también inhibida por AMP, CTP, glicina y alanina, esto puede indicar una posible autonomía en la biosíntesis de las purinas y de las pirimidinas (17),

para las cuales glutamina es uno de los donadores de nitrógeno.

Los iones como el Mg^{2+} y el Mn^{2+} han mostrado ser muy importantes en la actividad de la GS, aunque se ha encontrado que la actividad es mucho más baja con Mn^{2+} que con Mg^{2+} (1, 65).

La GS en hojas de Pisum sativum es estabilizada por Mg^{2+} en ausencia de ATP (44).

En 1980, Hirel y Gadal identificaron en arroz, dos formas de GS en hojas (GS_1 y GS_2) y una forma (GS_r) en raíz. La GS_1 fue predominante en hojas etioladas y la GS_2 en hojas verdes.

La GS_1 pareció ser una enzima citosólica y la GS_2 fue localizada en los cloroplastos (18). Sólo una GS fue detectada en raíz de arroz y cebada (21, 32), esta enzima está localizada en el citosol. Hay claras evidencias de que la GS en cloroplastos (GS_2) es solo activa en la luz (37).

A pesar de que la GS_r y la GS_1 están localizadas en el mismo compartimiento celular (el citosol), sus funciones fisiológicas son diferentes; la GS_r está involucrada en la asimilación primaria del amonio en raíces, en tanto que la GS_1 está involucrada en la recirculación del amonio durante la fotorrespiración pero también en la síntesis de glutamina en la oscuridad (18).

Las actividades de la GS_1 y GS_2 presentan un máximo a $45^{\circ}C$, sin embargo la GS_2 es drásticamente afectada a $60^{\circ}C$ y GS_1 es estable a temperaturas menores de $65^{\circ}C$ (14).

En 1980, Barratt encontró que en cebada, soya y arroz había dos diferentes formas de GS (4). Posteriormente en 1981 (5), encontró que en haba había cinco diferentes formas de GS: GS_1 y GS_2 se encontraban en cloroplasto, GS_4 y GS_5 en citoplasma y GS_3 fue observada en extractos de raíz en plántulas de tres semanas de edad, que estuvieron en un pretratamiento por 24 horas con NH_4Cl , NH_4NO_3 ó urea.

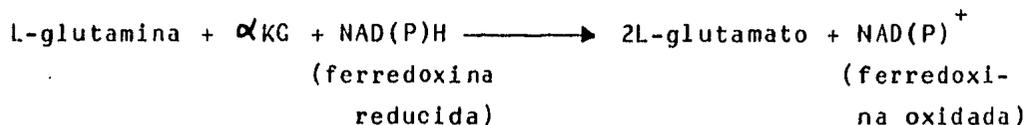
Kretovich (24), observó que cuando se infiltraban iones amonio dentro de la hoja intacta había un incremento en la actividad de la GS, tanto en la del cloroplasto como en la del citosol.

Un estudio de la composición de los aminoácidos de GS₁ y GS₂ en hojas de calabaza, muestra notables diferencias entre las dos formas moleculares. La GS₁ contiene: ácido glutámico, leucina, glicina y alanina, mientras que la GS₂ contiene cantidades apreciables de glicina, ácido aspártico, leucina y lisina (24), lo que indica que se trata de isoenzimas.

Se ha encontrado una GS activa en plántulas, de frijol, y está localizada en los cotiledones y en las raíces (13), en extracto de raíces de plántulas de arroz crecidas en altas concentraciones de amonio, la actividad se ve incrementada por la adición del ácido 2-oxoglutámico (2).

Existen pocos reportes en la literatura donde el nitrato o amonio han sido utilizados para trazar el curso del nitrógeno en la raíz (2, 23, 42).

En 1979, Tempest encontró en la bacteria Aerobacter aerogenes, a la GOGAT como una enzima actuando en una ruta alterna para la asimilación del amonio junto con la GS (63). Tempest y colaboradores mostraron que cuando el amonio es limitante en el crecimiento de A. aerogenes, los niveles de GS y GOGAT suben y la GDH disminuye. La GOGAT procede (11), de acuerdo a la siguiente reacción:



Lea y Mifflin encontraron que la GOGAT dependiente de ferredoxina, localizada en los cloroplastos depende de la luz para poder efectuar la conversión de 2-oxoglutarato a glutamato (27).

El NADH y el NADPH son eficientes donadores de electrones para las enzimas que se obtienen de extractos de endospermo y raíces de maíz (41), sin embargo en soya se ha encontrado que la actividad de la GOGAT fue mucho mayor con NADH que con NADPH (56).

Otros estudios muestran que las enzimas de raíces de arroz (3), y células de tabaco no utilizan NAD(P)H, pero usan ferredoxina o metilviológeno (MV) en forma reducida como donadores de electrones (33, 35). En extractos de raíces de arroz se observó que el MV, puede ser un sustituto de la ferredoxina pero la actividad de la GOGAT con este compuesto fue aproximadamente el 25 % de la obtenida con ferredoxina (3).

Oaks y Jones encontraron una marcada estimulación en la actividad de la GOGAT cuando añadían NH_4Cl a sus preparaciones (extractos de endospermo y raíces de maíz). También encontraron que la GOGAT es activada por KCl (41).

La GOGAT al igual que la NiR requiere ferredoxina para su actividad, la cual es producida en los cloroplastos en presencia de luz, en raíz la ferredoxina aparentemente no funciona como fuente natural de donación de electrones para la NiR y la GOGAT (48). La actividad dependiente de ferredoxina, en cebada, está restringida a las hojas (70).

En haba se observó que la azaserina así como el CoCl_2 , el CdCl_2 y el NiCl_2 , son potentes inhibidores de la GOGAT, a comparación con la GDH que se activa con NiCl_2 y CaCl_2 (68).

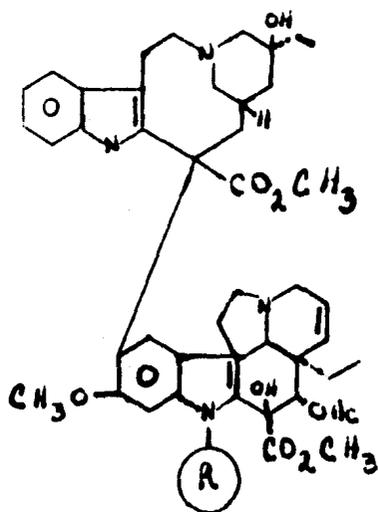
Susuki y Gadal (59), encontraron que la asparagina y el oxalacetato no pueden sustituir a la glutamina y al 2-oxoglutarato como el donador amido y el aceptor amido respectivamente (56). Según Beevers y Torey (6), los cotiledones de Pisum sativum contienen una GOGAT la cual muestra una gran especificidad por glutamina como el donador amido.

La presencia de GOGAT dependiente de ferredoxina en algas azul verdes y de una isoenzima dependiente de NADPH en raíz y otros tejidos de plantas han sugerido que esta ruta funciona en plantas superiores (36).

1.2 BIOSINTESIS DE ALCALOIDES

En 1941, estudiando la inactivación por calor de cierto tipo de virus in vivo, Kunkel encontró que Catharanthus roseus era capaz de soportar temperaturas relativamente altas durante períodos largos de tiempo y que además era susceptible a Phytopomonas tumefasciens (hoy Agrobacterium tumefasciens) microorganismo capaz de inducir tumores, lo cual la hacía adecuada para sus experimentos (25); por esta razón se empezó a utilizar en estudios fisiológicos.

Veinte años más tarde el grupo Ely encontró que en los extractos de C. roseus, había alcaloides los cuales eran efectivos en ratones con leucemia P-1534 (62). Tiempo después se encontró que la vincristina y la vincoleucoblastina eran los agentes antileucémicos.



R = CH₃ ; vincoleucoblastina
(VLB)

R = CHO ; vincristina
(VCR)

Como el contenido de estos alcaloides es extremadamente bajo en la planta, se encuentran aproximadamente en una proporción de 1 g y 20 mg / 1000 kg respectivamente (15), es muy importante conocer el mecanismo de regulación en la biosíntesis de alcaloides indólicos en plantas superiores con el fin de modificarla para incrementar su producción.

La gran mayoría de los estudios se han concentrado en el metabolismo de los alcaloides monoméricos, sobre todo en la ajmalicina, cuya ruta metabólica es paralela a la ruta hacia VCR y VLB.

En la figura I.2 se observa la ruta biosintética de la strictosidina, la cual tiene una función clave en la biosíntesis de los alcaloides de C. roseus (67). Como se indica, el nitrógeno es derivado de triptamina y el resto de la molécula de un monoterpénoide tipo corinante, el glucósido iridoide : secologanina (58, 76).

La enzima que hidroliza al geraniol y al nerol a los derivados 10-hidroxi, es una oxigenasa del grupo citocromo P-450, esta enzima se encuentra localizada en vacuolas o provacuolas.

Por otra parte ha sido encontrada una enzima que cataliza la reacción de geraniol a geranial, y de nerol a neral, en la presencia de NAD^+ ó NADP^+ y la reacción inversa cuando NADH ó NADPH es usado. Esta oxidación puede estar involucrada en la biosíntesis, tal vez como un intermediario entre el 10-hidro-xigeraniol (o nerol) y ácido logánico, pero este punto no ha sido aún comprobado.

Después de que ha sido producida la secologanina a partir de ácido logánico; hay una condensación enzimática estereoespecífica de triptamina y secologanina, para dar strictosidina.

Esta condensación se lleva a cabo por medio de una enzima conocida como strictosidina sintetasa (55, 67).

BIOSINTESIS DE ESTRICTOSIDINA

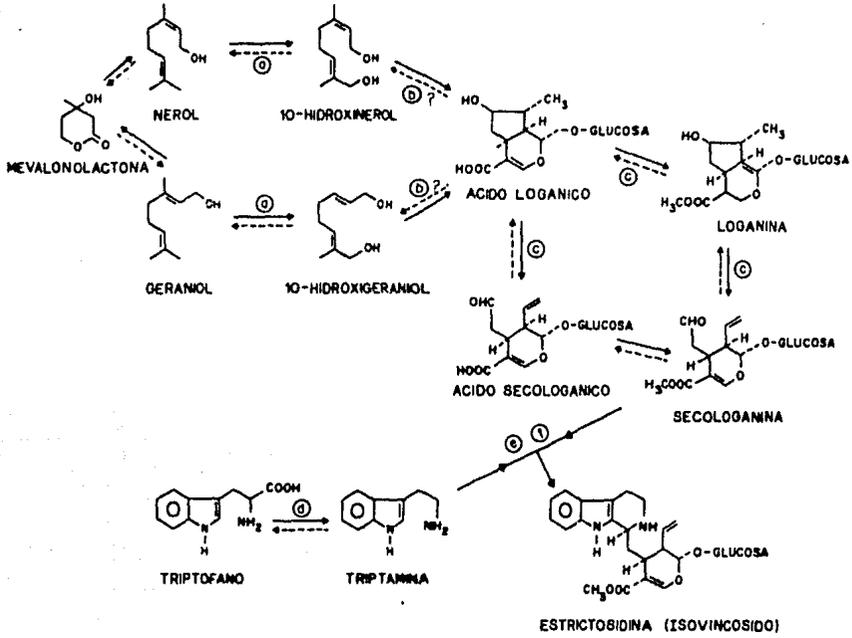


Figura I.2 Biosíntesis de estrictosidina.

- a) oxigenasa
- b) ?
- c) metiltransferasa
- d) triptofano descarboxilasa
- e) complejo ajmalicina sintetasa
- f) estrictosidina sintetasa

La estrictosidina resultante tiene una estereoquímica $3\alpha(S)$ (15), ésta es la configuración que se necesita para la formación biosintética de los alcaloides indólicos monoterpénoides (55).

A través de un complejo enzimático (figura I.3), la estrictosidina por medio de una glucosidasa biosintetisa catenamina.

En 1979 Lee y Hirata (28), encontraron que a partir de catenamina se llevaba a cabo la conversión a ajmalicina, por medio de la enzima catenamino reductasa, la cual demostró ser dependiente de NADPH.

Por otra parte Stöckigt y Husson hicieron un experimento control en el cual desnaturalizaban la enzima por calor o se ponía en ausencia de NADPH, y observaban que la ajmalicina no se formaba. De lo anterior se dedujo que la catenamino reductasa era totalmente dependiente de NADPH (54).

Lee y Hirata (28), encontraron también que había un intermediario muy inestable, la geisoschisina, pero que jugaba un papel muy importante en el metabolismo intermedio de ajmalicina (figura I.4).

A partir de ajmalicina y hasta la biosíntesis final de los alcaloides de C. roseus no se conoce exactamente cuantas y cuales son las enzimas que intervienen; solo se conocen algunos intermediarios, como se muestra en la figura I.3 .

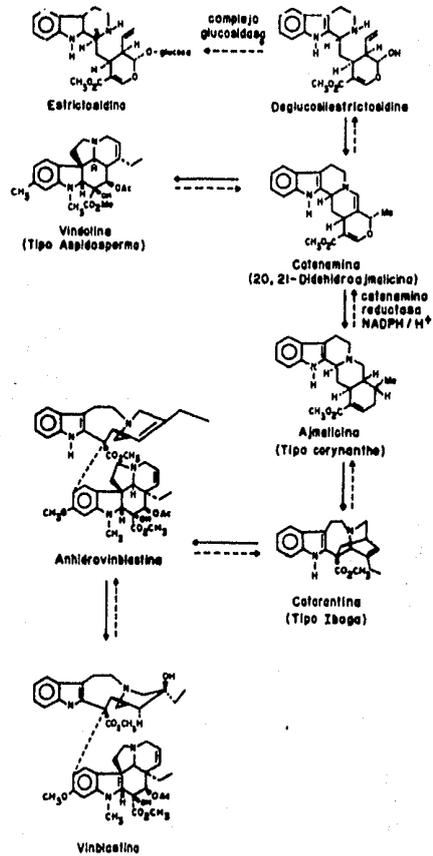


Figura 1.3 Biosíntesis de Vinblastina

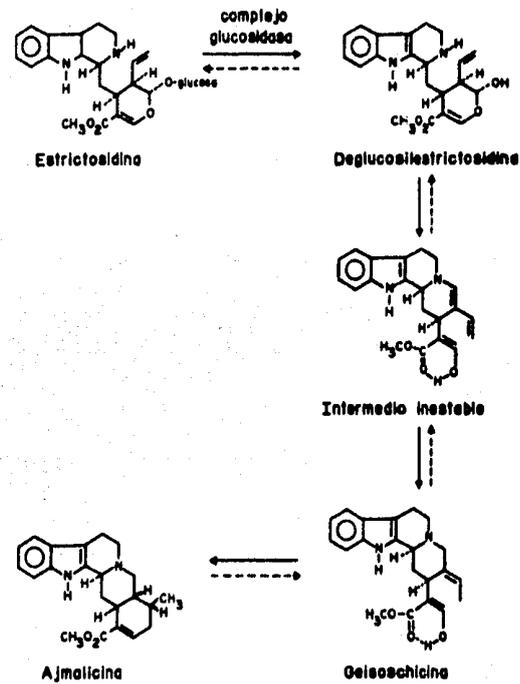


Figura 1.4 Biosíntesis de Ajmalicina

II MATERIALES Y METODOS

II.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Las semillas de Catharanthus roseus se germinaron en tierra, estando en un invernadero con una temperatura de 32°C a 36°C.

II.2 MATERIAL DE VIDRIO

Todo el material de vidrio utilizado se lavó con detergente, se enjuagó con agua desionizada y se secó en estufa.

II.3 EQUIPO

Potenciómetro, Beckman 3550

Placas de calentamiento y agitación

Centrífuga, Beckman J2-21

Espectrofotómetro, Carl Zeiss M4 Q111

Espectrofotómetro, Pye Unicam SP-1800 con control de temperatura, programador de tiempo y graficador.

Politrón, PCU-2

Licuada, Osterizer

Baño de temperatura constante, Colora

Balanza analítica, Mettler

II.4 REACTIVOS

Los reactivos utilizados fueron todos de grado reactivo, de las casas: J.T. Baker, Merck y Sigma.

II.5 DISEÑO EXPERIMENTAL (PRIMERA PARTE)

Las muestras (hojas), fueron cortadas a las 9 de la mañana, se escogieron hojas del mismo tamaño y se pusieron a incubar en las

diferentes fuentes nitrógenadas, en luz continua y con agitación suave por los tiempos indicados (ver tabla 2.1).

Con estas hojas se procedió a preparar los extractos enzimáticos y se midió la actividad de cada una de las enzimas (GDH, GS y GOGAT), así como las pozas de aminoácidos, nitratos, nitritos y amonio.

II.6 PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO

Para la preparación del extracto enzimático de los dos tejidos empleados (hojas y raíces), se siguió el procedimiento mencionado a continuación:

- 1.- El tejido (hoja o raíz) se congeló a -70°C por 3 ó más horas.
- 2.- El tejido congelado se molió en un mortero hasta convertirlo en un polvo muy fino, el cual se dejó descongelar.
- 3.- Una vez descongelado el tejido pulverizado se le adicionó el buffer de extracción* en una relación 1:2.5 peso en volumen y 5 % (p/p) de polivinilpirrolidona.
- 4.- La mezcla se homogenizó por 2 minutos en licuadora o en politrón.
- 5.- El extracto obtenido en el paso 4 se pasó por 4 capas de gasa.
- 6.- El filtrado se centrifugó a 14000 g durante 30 minutos en el rotor JA-20 en la centrífuga J2-21.
- 7.- El sobrenadante de la centrifugación (extracto crudo) fue utilizado para las determinaciones enzimáticas.

* a) Se usó buffer Tris-HCl 50 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, mercaptoetanol 5 mM, pH=8.2 (para medir GDH, GS y GOGAT-NAD(P)H).

b) Se usó buffer de Fosfatos 50 mM, EDTA 1 mM, mercaptoetanol 5 mM, pH=7.5 (para medir GOGAT-Ferredoxina).

Fuente de nitrógeno:	a) H_2O
	b) NO_3^- 20 mM
	c) NH_4^+ 2 mM
	d) $NO_3^- + NH_4^+$ (20 y 2 mM)
Tiempo de incubación para cada fuente :	a) 0 horas
	b) 2 "
	c) 4 "
	d) 8 "

Tabla 2.1

II.6.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GDH-NAD(P)H

La actividad de la GDH-NADH se determinó por el método de Joy (20) con ciertas modificaciones (31). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	1.7 ml	pH 8.2
α KG	10 mM	0.5 ml	pH 7.0
NH ₄ Cl	100 mM	0.5 ml	
NAD(P)H	160 μ M	0.2 ml	
Extracto		<u>0.1 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes, excepto el NAD(P)H se incubó a 30°C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo el NAD(P)H. Se graficó la disminución en la absorbancia a 340 nm. Se usó sólo la parte lineal de la gráfica.

La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris. La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NAD(P)H transformados por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la figura 2.2 .

II.6.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GDH-NAD(P)⁺

Para la determinación de la GDH-NAD⁺ se usó el método de Loyola (31). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	2.1 ml	pH 9.4
Glu	60 mM	0.5 ml	
NAD(P) ⁺	600 μ M	0.2 ml	pH 8.0
Extracto		<u>0.2 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes, excepto el NAD(P)⁺, se incubó a 30°C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo el NAD(P)⁺.

Se graficó el incremento en la absorbancia a 340 nm. Se usó sólo la parte lineal de la gráfica.

La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris. La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NAD(P)^+ transformados por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la figura 2.2.

II.6.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GS

La actividad de la GS se midió por el método modificado por Kanamori y Matsumoto (22). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	50 mM	1.5 ml	pH 7.5
ATP	6.6 mM	0.2 ml	pH 7.0 rp
Glu-Na	192 mM	0.5 ml	
MgSO_4	333 mM	0.1 ml	
NH_2OH	20 mM	0.3 ml	pH 7.0 rp
Cisteína	3.3 mM	0.1 ml	
Extracto		<u>0.3 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

rp=recien preparado

La reacción se inició con la adición del glutamato. La mezcla se incubó por 30 minutos a 37°C en lugar de los 15 minutos y los 30°C respectivamente del método original. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris. En cada determinación se usó un blanco a tiempo cero, es decir, contenía todos los reactivos y el mismo volumen de extracto enzimático pero la reacción se detenía a tiempo cero adicionando 1 ml del reactivo de cloruro férrico.

El γ -glutamil- γ -hidroxamato formado se determinó adicionando 1 ml del reactivo de cloruro férrico (volúmenes iguales de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 10% en HCl 0.2 N, ATC al 24% y HCl al 50%).

Se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm y se midió el incremento en la absorbancia a 540 nm respecto a cada blanco.

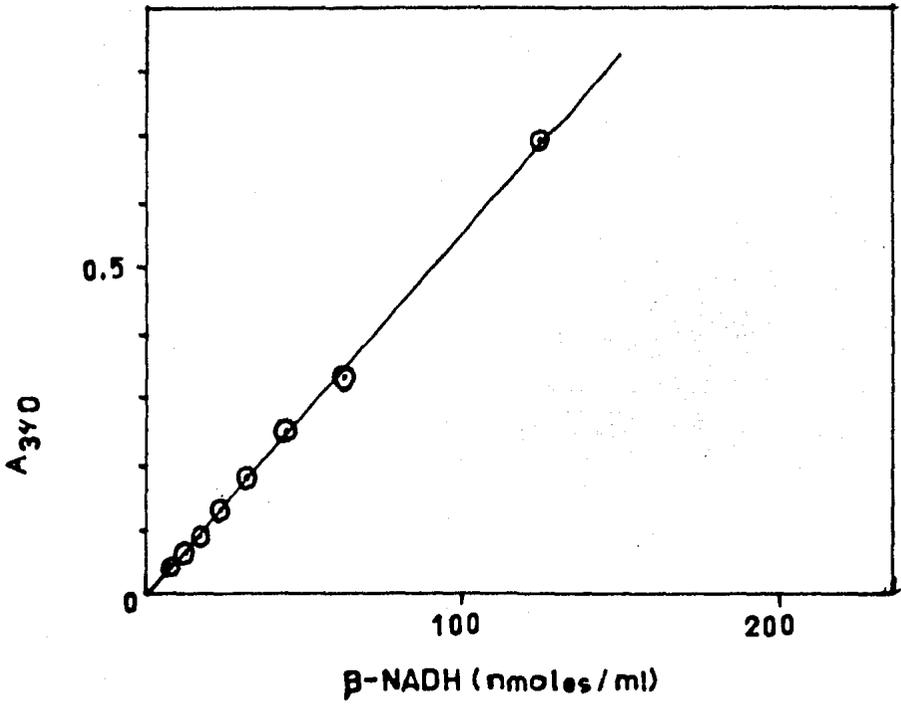


Figura 2.2 Gráfica de calibración para β -NADH.

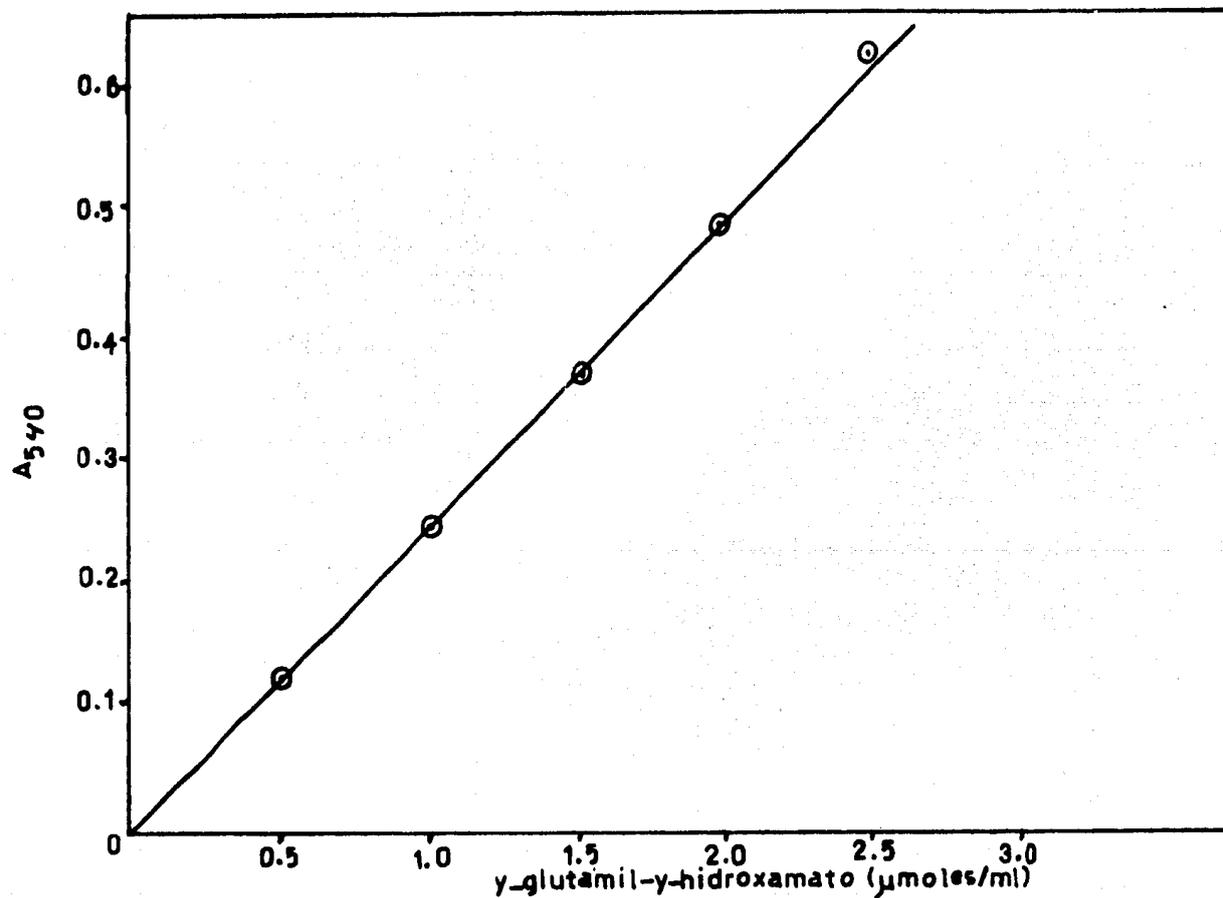


Figura 2.3 Curva de calibración para la determinación de la GS.

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de γ -glutamil- γ -hidroxamato formado por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la figura 2.3 .

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de γ -glutamil- γ -hidroxamato por minuto bajo las condiciones de ensayo. La actividad específica se expresó como unidades de enzima por miligramo de proteína.

II.6.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GOGAT

II.6.4.1

La actividad de la GOGAT-NAD(P)H se determinó por el método de Beevers y Storey (6), con las modificaciones introducidas por Loyola (31). La mezcla de reacción contenía:

Tris-HCl	100 mM	1.5 ml	pH 7.5
α KG	10 mM	0.5 ml	pH 7.0
Gln	30 mM	0.5 ml	
NAD(P)H	80 μ M	0.2 ml	
Extracto		<u>0.3 ml</u>	
Volumen total		3.0 ml	

La mezcla de todos los componentes, excepto el NAD(P)H, se incubó a 30°C por dos minutos y después se inició la reacción añadiendo NAD(P)H. Se graficó la disminución en la absorbancia a 340 nm. Se usó sólo la parte lineal de la gráfica. La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final, excepto para el Tris.

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de NAD(P)H transformados por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la figura 2.2 .

Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produce un cambio de 0.001 en la absorbancia a 340 nm por minuto.

II.6.4.2

La actividad de la GOGAT dependiente de ferredoxina se determinó por el método de Match (34) con modificaciones introducidas en el presente trabajo. La mezcla de reacción contenía:

Fosfatos	10 mM	0.3 ml	pH 7.5	
α KG	10 mM	0.6 ml	pH 7.0	
Gln	10 mM	0.6 ml	pH 7.0	
Metilviológeno	19 mM	0.6 ml		rp
Extracto		0.3 ml		
Mezcla $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	92 mM	<u>0.6 ml</u>		rp
Volumen total		3.0 ml		

rp=recien preparado

La reacción se llevó a cabo al agregar a la mezcla de los componentes la mezcla de ditionito de sodio, se incubó a 30°C por 30 minutos, para parar la reacción se hirvió por 2 minutos.

Después se pasó la mezcla de reacción por una columna de resina Dowex (2 cm), se lavó con 10 ml de agua desionizada y se eluyó el ácido glutámico con 4 ml de ácido acético 2 M.

Se neutralizó con NaOH 1 N. Se tomo 1 ml y se agregó 1 ml de una solución de isopropanol 1:1 y se leyó a 570 nm.

La molaridad de las soluciones se refiere a la molaridad final excepto para el buffer de fosfatos.

La velocidad de la reacción se expresó como nmoles de glu transformados por minuto, para lo cual se utilizó la gráfica de calibración de la figura 2.4 .

II.6.5 DETERMINACION DE LAS PROTEINAS

Se siguió la técnica de Peterson (46). Se realizó una curva patrón con albúmina de suero bovino. El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras es el mismo:

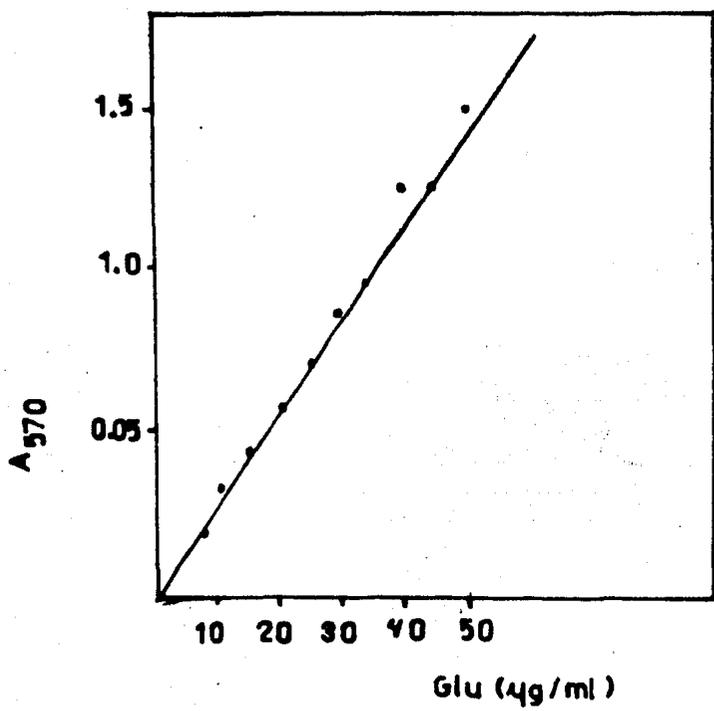


Figura 2.4 Gráfica de calibración para Glu.

Muestra: 0.2 ml + 0.8 ml de agua destilada

+

0.1 ml de desoxicolato de sodio al 0.15%
(reposar por 10 minutos a temperatura ambiente)

+

0.1 ml de ácido tricloroacético al 72%

↓

centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos

↓

pastilla + 1 ml de agua destilada

+

1 ml de reactivo A

↓

reposar 30 minutos a temperatura ambiente

+

0.5 ml de reactivo B

↓

reposar 30 minutos a temperatura ambiente
y leer absorbancia a 750 nm

reactivo A:

- solución base de cobre-tartrato-carbonato (CTC) (0.1% de $\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 10% de Na_2CO_3 ; 0.2% de $\text{KC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).
- NaOH 0.8 N
- dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS)
- agua destilada

reactivo B:

Un volumen de reactivo de Folín-Ciocalteu es mezclado con cinco volúmenes de agua destilada.

La curva patrón se obtiene graficando concentración en gramos de albúmina contra absorbancia a 750 nm. Ver gráfica de calibración 2.5 .

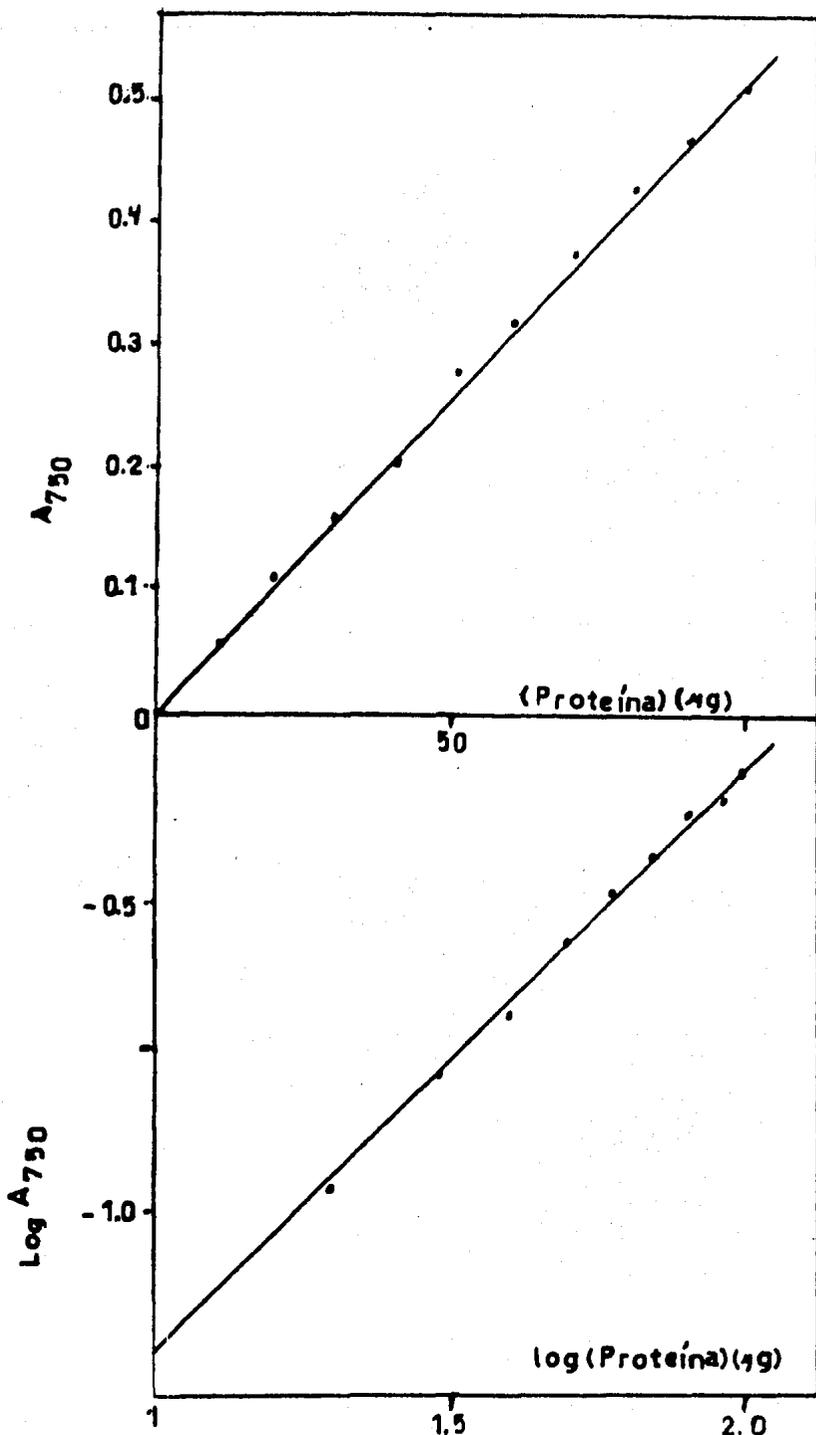


Figura 2.5 Curva de calibración para la determinación de las proteínas.

II.6.6 DETERMINACION DE GLUTAMATO

Se siguió la técnica de Cocking (9). Se realizó una curva patrón con ácido glutámico. El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras es el mismo:

Muestra: 0.1 ml + 0.9 ml de agua destilada

+
1 ml de reactivo de ninhidrina
↓
se pone a ebullición 30 minutos

+
2.5 ml de isopropanol al 50%
↓
reposar 15 minutos a temperatura ambiente y leer a 570 nm

reactivo de ninhidrina:

- amortiguador de citratos 0.2 M pH=5±0.1 (recien preparado)
- NaOH al 4%
- solución A: 2.1008 g de ácido cítrico monohidratado + 20 ml de NaOH al 4%, aforar a 50 ml → A
- solución B: 0.08 g de SnCl_2 a los 50 ml (A) → B

La curva patrón se obtiene graficando concentración en μg de glu contra absorbancia a 570 nm. Ver gráfica de calibración figura 2.4 .

II.6.7 DETERMINACION DE AMONIO

Se determinó por la técnica de Nessler (57). Se realizó una curva patrón con NH_4Cl .

El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras es el mismo:

Muestra: 0.5 ml + 4.5 ml de agua destilada

+

0.5 ml de reactivo de Nessler



leer a los 30 minutos a 385 nm

reactivo de Nessler:

- 10 g de HgI_2 + 7 g de KI en 10 ml de agua fría
- 16 g de NaOH disueltos en 70 ml de agua fría
- mezclar las dos soluciones anteriores lentamente, sin que se caliente y aforar a 100 ml (en oscuridad)
- para usar tomar 1 ml de reactivo y diluir con agua a 10 ml.

La curva patrón se obtiene graficando concentración en μg de NH_4Cl contra absorbancia a 385 nm. Ver gráfica de calibración figura 2.6 .

II.6.8 DETERMINACION DE NITRATOS

Se siguió la técnica de Nicholas y Nason (39). Se realizó una curva patrón con KNO_3 . El procedimiento a seguir para la curva patrón es el mismo para el ensayo de las muestras:

Muestra: 0.1 ml + 1.4 ml de agua destilada

+

0.1 ml de ácido sulfámico al 10%



dejar reposar dos minutos

+

0.4 ml de HClO_4 al 20%



agitar y medir absorbancia a 210 nm

La curva patrón se obtiene graficando concentración en μg de KNO_3 contra absorbancia a 210 nm. Ver figura 2.7 .

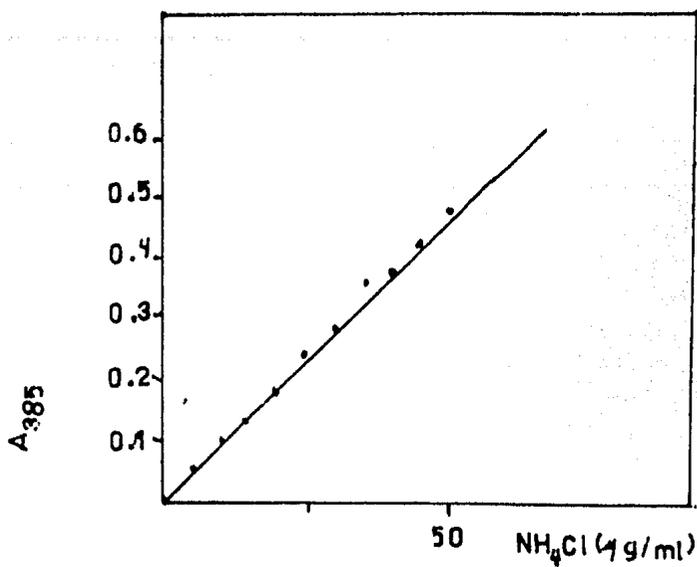


Figura 2.6 Curva de calibración para la determinación de amonio.

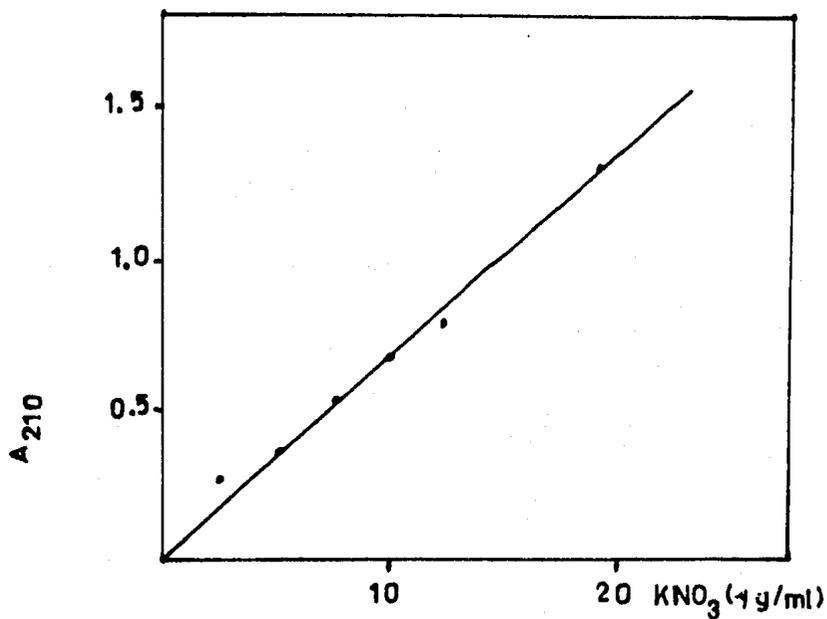


Figura 2.7 Curva de calibración para la determinación de nitrato.

II.6.9 DETERMINACION DE NITRITOS

Se siguió la técnica de Nicholas y Nason (39). Se realizó una curva patrón con NaNO_2 . El procedimiento a seguir para la curva patrón y el ensayo de las muestras es el mismo:

Muestra: 0.1 ml + 1.9 ml de agua destilada

+

1 ml de sulfanilamida

+

1 ml de naftilendiamina (NED) 0.02%



leer a 540 nm después de 10 minutos

- 1 g de sulfanilamida a 25 ml de H_2SO_4 en 100 ml de agua destilada.

La curva patrón se obtiene graficando concentración en rmoles de NaNO_2 contra absorbancia a 540 nm. Ver gráfica de calibración figura 2.8 .

II.7 DISEÑO EXPERIMENTAL (SEGUNDA PARTE)

Plantas de Catharanthus roseus de la misma edad (5 meses), fueron regadas durante un mes con las diferentes fuentes nitrógenadas: NO_3^- 20 mM, NH_4^+ 2 mM, $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ a las mismas concentraciones respectivamente y con agua destilada como un control.

Después del tiempo mencionado, se cortaron hojas del mismo tamaño, a la misma hora y se determinó alcaloides, GDH, GS, GOGAT y las diferentes pozas (nitratos, nitritos, amonio y aminoácidos). Todo lo anterior se midió también en raíces excepto alcaloides.

II.7.1 DETERMINACION DE ALCALOIDES

Primero se llevó a cabo una extracción (figura 2.9), para lo cual se utilizaron 8 g de muestra (hojas), se suspendieron en 100 ml de metanol y se extrajo a 50°C, usando un baño maría por 4 horas. La suspensión se filtró y el sólido se reextrajo con 100 ml de metanol 2 veces y a continuación se evaporó, el residuo se suspendió en HCl 1 N (30 ml) y se lavó con acetato de etilo (4x30 ml).

La solución acuosa se neutralizó con bicarbonato de sodio, el pH se ajustó a 9.5 (NaOH 1 N) y se extrajo con acetato de etilo (4x30 ml). Los extractos combinados fueron secados y se pesó para determinar alcaloides totales (26).

A este extracto se le hicieron pruebas con reactivos generales para identificar alcaloides, en este caso se utilizó el reactivo de Dragendorff.

II.7.2

En hojas y raíces se midieron tanto las enzimas como las pozas por los métodos mencionados en páginas anteriores.

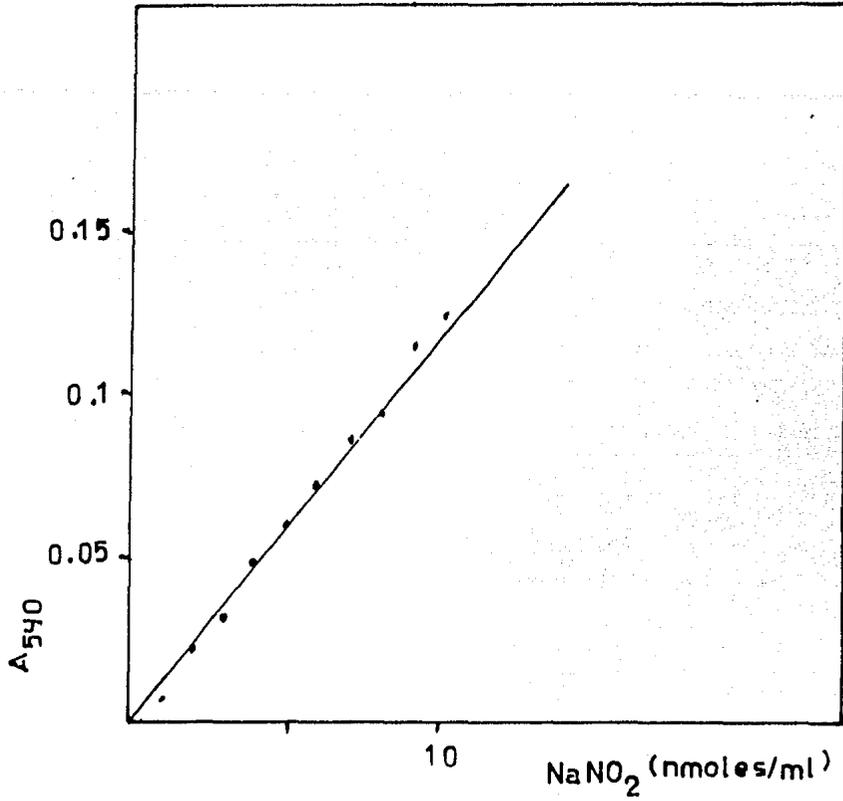
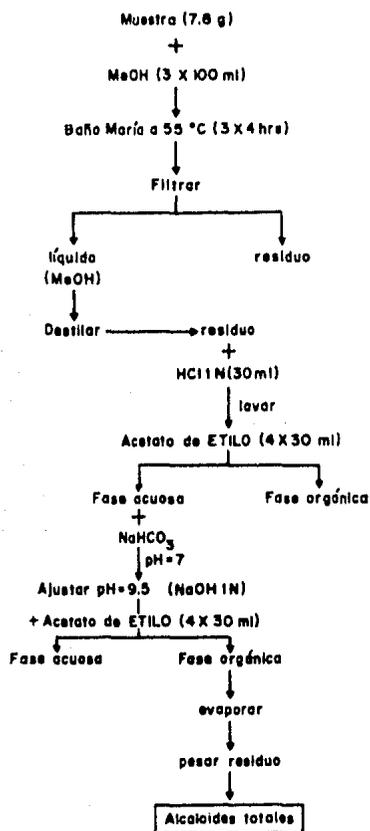


Figura 2.8 Curva de calibración para la determinación de nitritos.

EXTRACCION DE ALCALOIDES



Kutney, P. J. and Lewis, S. L. (1980) *Phytochem.*, 19: 2589-2595.

Figura 2.9 Extracción de alcaloides.

III R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

III.1 EFECTO DE LA FUENTE NITROGENADA EN HOJAS DE C. ROSEUS

III.1.1 Efecto sobre la actividad de la GDH.

En las figuras: 3.2, 3.3 y 3.4 se observa que la actividad de la GDH tanto en sentido aminativo (GDH-NADH) como en el desaminativo (GDH-NAD⁺), aumenta considerablemente con respecto al control que fue agua (figura 3.1). En orden decreciente, la mayor actividad de la GDH en ambos sentidos se presenta en la fuente de amonio 2 mM + nitrato 20 mM, le sigue la fuente de nitrato 20 mM y por último la de amonio 2 mM.

Todo esto coincide con lo reportado en estudios sobre otros sistemas (31, 42, 49), ya que la actividad de la GDH en ambos sentidos aumenta cuando hay concentraciones elevadas de amonio y de nitrato.

En la fuente de nitrato + amonio 20 y 2 mM respectivamente, se presentó la mayor actividad de la GDH-NADH. En la figura 3.8 se puede ver el porque del alto porcentaje de actividad en esta fuente, y esto se debe a que hay un exceso de amonio, ya que el nitrato está siendo convertido en amonio por medio de la nitrato y la nitrito reductasa (NR y NiR), este amonio producido y el ya presente ocasionan un incremento en la poza de amonio, lo que ocasiona que la actividad de la GDH-NADH sea elevada (figura 3.4). Por otra parte, al estarse convirtiendo el nitrato en amonio, la poza de nitrato (figura 3.8) va disminuyendo.

En la fuente de nitrato 20 mM (figura 3.2), la actividad de la GDH en ambos sentidos, es también alta con respecto al blanco que es agua (figura 3.1), en este caso la poza de amonio y de nitratos (figura 3.6) están elevadas hasta el tiempo=4 horas, después de este tiempo la cantidad en por ciento de nitratos y

o/o Actividad (nmoles NADH/min.mg proteína)

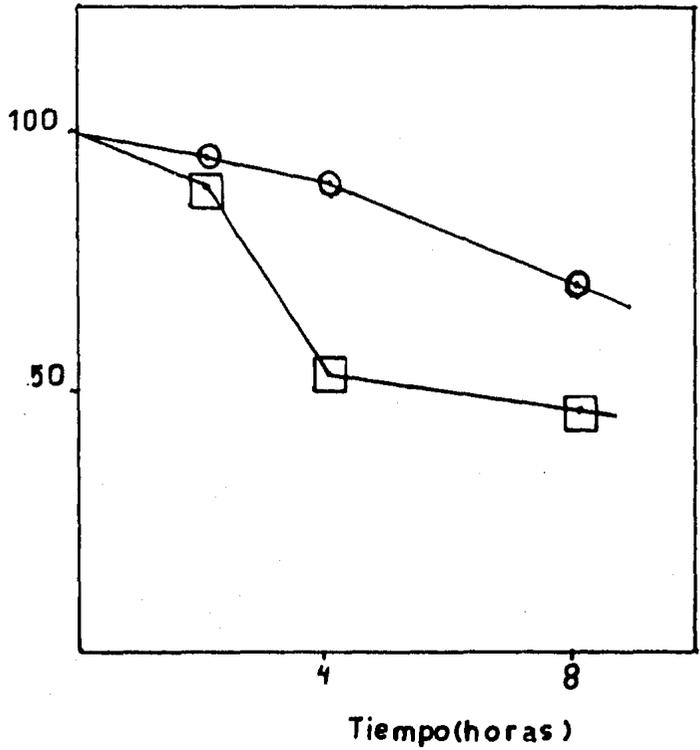


Figura 3.1 Actividad de la GDH-NADH (O) y (□) GDH-NAD⁺, en hojas incubadas en H₂O, sin fuente de nitrógeno. Las hojas se incubaron en 100 ml de agua por los tiempos indicados con agitación e iluminación continua.

o/o Actividad (nmoles NADH /min.mg proteína)

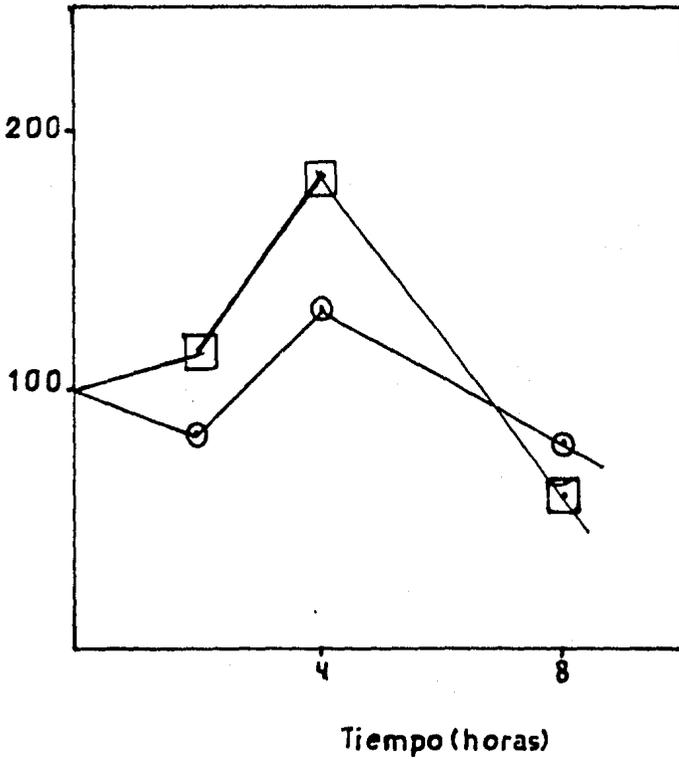


Figura 3.2 Actividad de la GDH-NADH(○) y (◻) de la GDH-NAD⁺, en hojas incubadas en una fuente de NO₃⁻ 20mM, Las hojas se incubaron por los tiempos indicados con agitación e iluminación continua.

% Actividad (nmoles NADH/min. mg proteína)

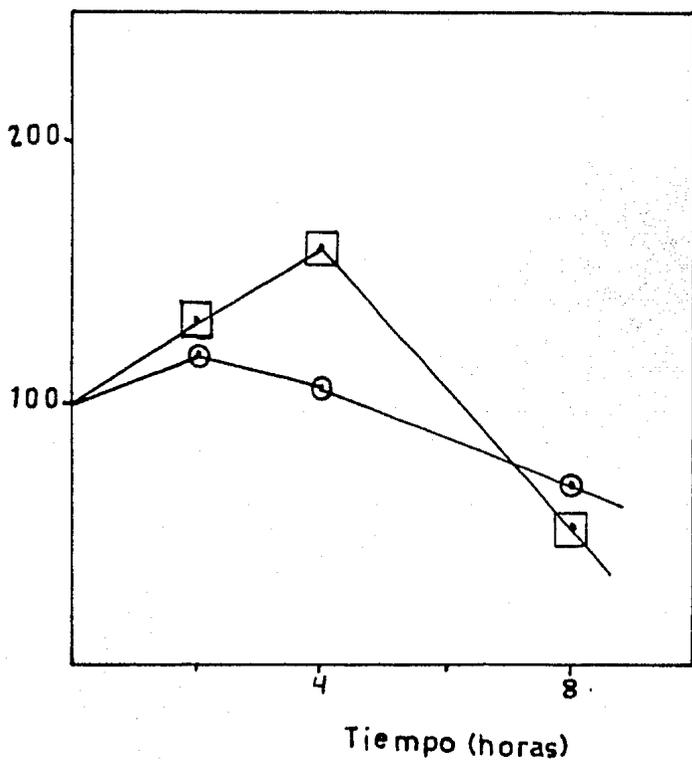


Figura 3.3 Actividad de la GDH-NADH (O) y la GDH-NAD⁺ (□), en hojas incubadas en una fuente de NH₄⁺ 2 mM. Las hojas se incubaron por los tiempos indicados con agitación e iluminación continua.

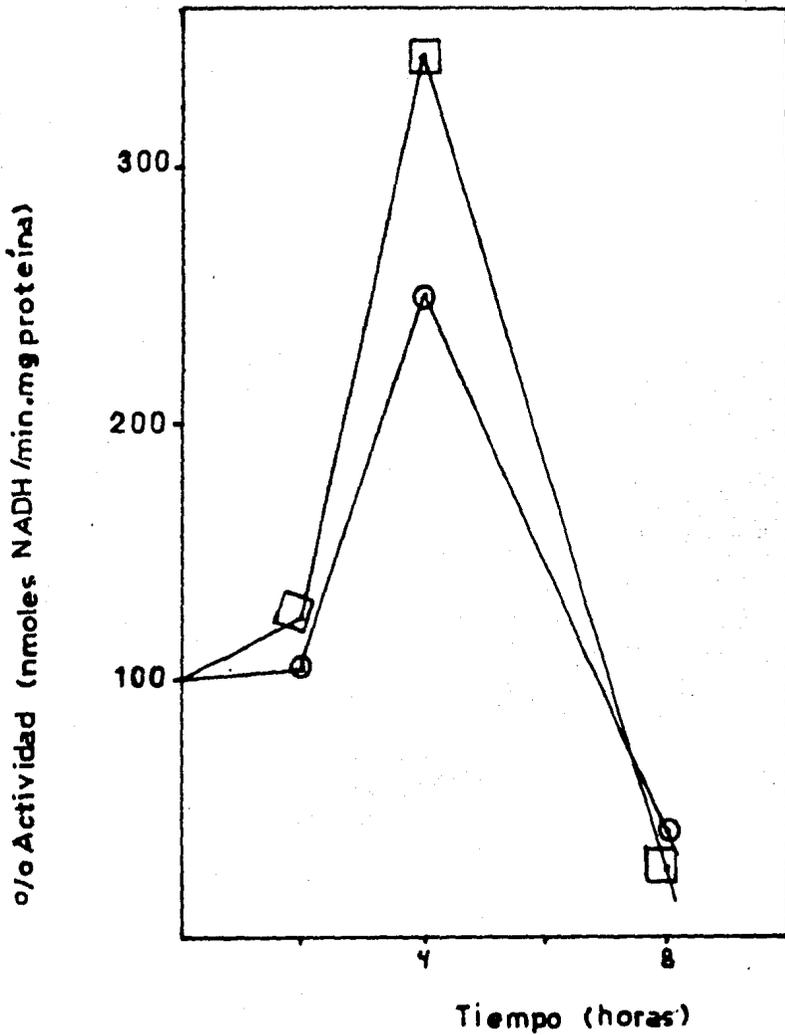


Figura 3.4 Actividad de la GDH-NADH (○) y de la GDH-NAD⁺ (□), en hojas incubadas en una fuente de NO₃⁻ 20 mM + NH₄⁺ 2 mM. Las hojas se incubaron por los tiempos indicados con agitación e iluminación continua.

de amonio baja y por consecuencia la actividad de la GDH en ambos sentidos también disminuye.

En la fuente de amonio 2 mM (figura 3.3), la actividad de la GDH tanto en sentido aminativo como desaminativo, aumenta muy poco con respecto al control que es agua (figura 3.1), al ver la poza de amonio y la de nitrato (figura 3.7), se observa que hay muy poco amonio y que la poza de nitratos baja en el tiempo de 4 horas y sube muy poco al tiempo 8 horas. Lo anterior ocasiona que la actividad de la GDH-NADH empiece a bajar a partir del $t=2$ horas (figura 3.3).

Por otra parte en las figuras: 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4, es evidente que la actividad desaminativa (GDH-NAD⁺) se ve incrementada en mayor proporción que la actividad aminativa (GDH-NADH), excepto en el control que es agua (figura 3.1), esto sugiere que existe una regulación diferencial entre las dos actividades es decir bajo la misma condición la actividad desaminativa (GDH-NAD⁺) se comporta diferente a la aminativa (GDH-NADH).

Lo anterior puede deberse a lo siguiente: el sustrato para la GDH-NAD⁺ es glu y si observamos las figuras: 3.9, 3.10, 3.11 y 3.12: veremos que la poza de glu es bastante alta en todos los casos excepto en la fuente de amonio (figura 3.11), que es casi igual a la de agua (figura 3.9), esto puede indicar que el sistema produce glu y esto ocasiona que la actividad de la GDH-NAD⁺ sea siempre más alta que la actividad de la GDH-NADH.

Si vemos las figuras: 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4; se observa en todas ellas que al tiempo de 8 horas la actividad de la GDH tanto en sentido aminativo como en el desaminativo, presenta una caída bastante drástica, esto puede deberse a que también hay una caída en la poza de amonio al $t=8$ horas y a que la poza de nitratos en todos los casos baja al $t=4$ horas y al $t=8$ horas sube pero por debajo del 100% y se mantiene constante (figuras: 3.5, 3.7 y 3.8).

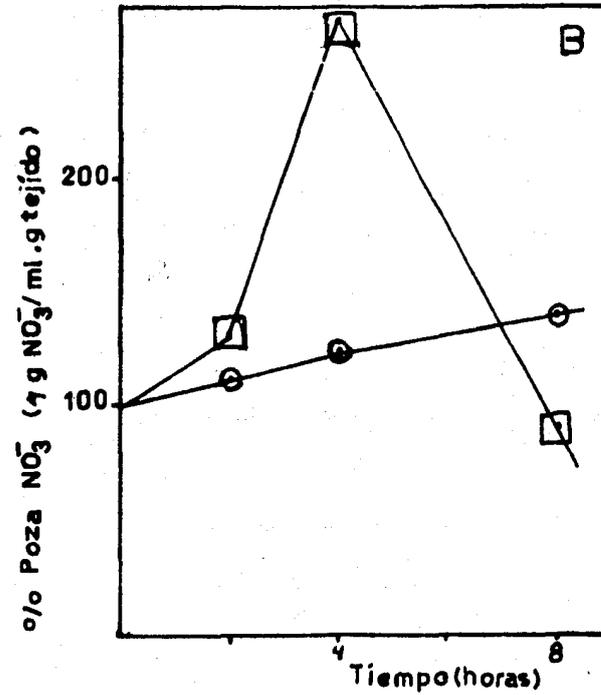
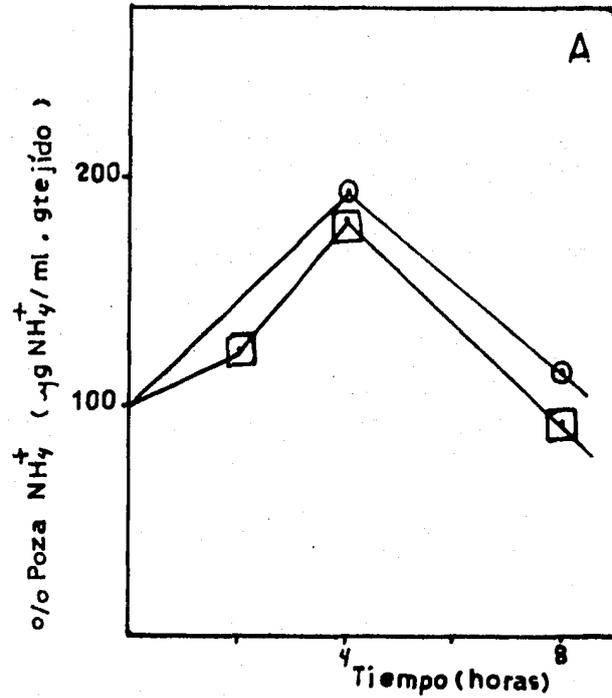


Figura 3.5 En la gráfica A se muestra como varió, la poza de amonio tanto para el extracto para medir GS y GDH (○), como para el de medir GOGAT (□); en la gráfica B se observa el % de la poza de NO_3^- para ambos extractos GS y GDH (○) y GOGAT (□). Lo anterior es de extractos hechos con hojas incubadas en H_2O sin fuente de nitrógeno.

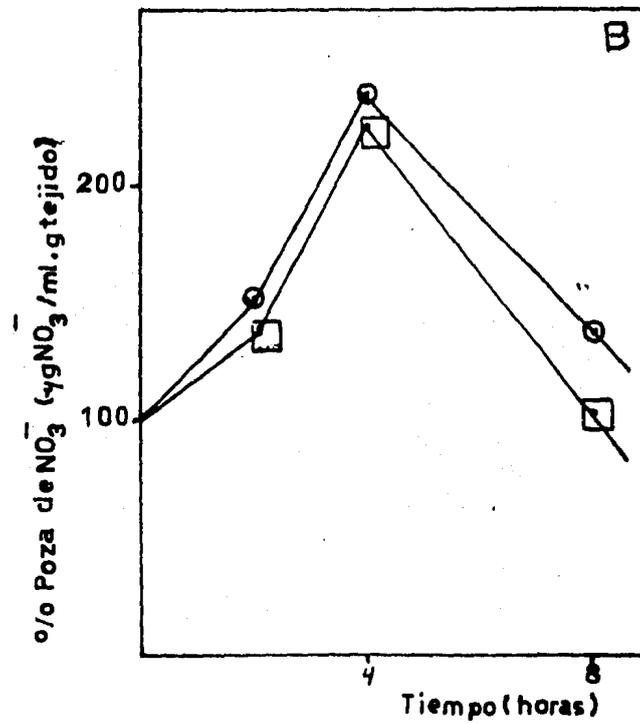
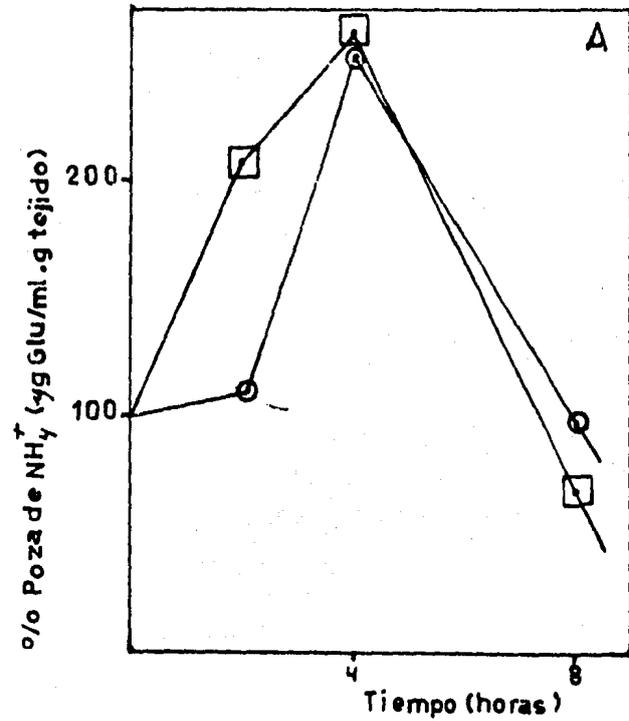


Figura 3.6 En la gráfica A se muestra el $\%$ de NH_4^+ para dos extractos: 1- GS, GDH (○); 2- GOGAT (□); en la gráfica B se observa el $\%$ Poza de NO_3^- para los extractos anteriores; todo esto es de extractos hechos con hojas incubadas en fuente de NO_3^- 20 mM.

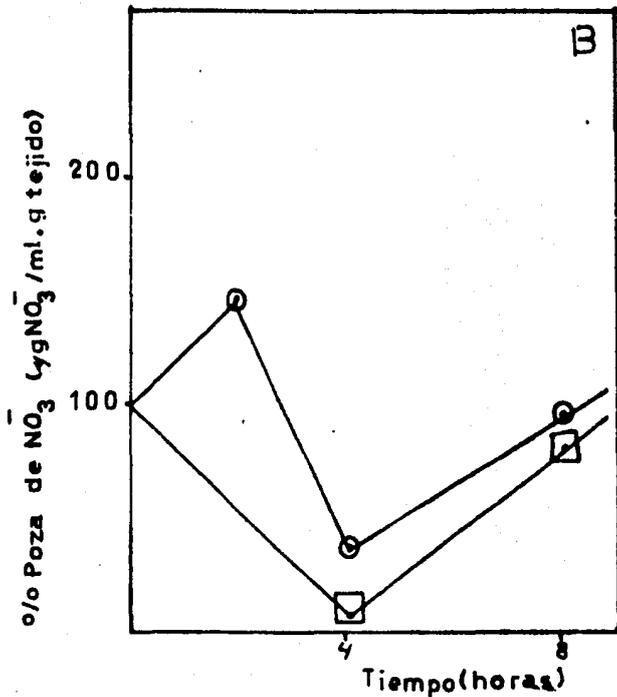
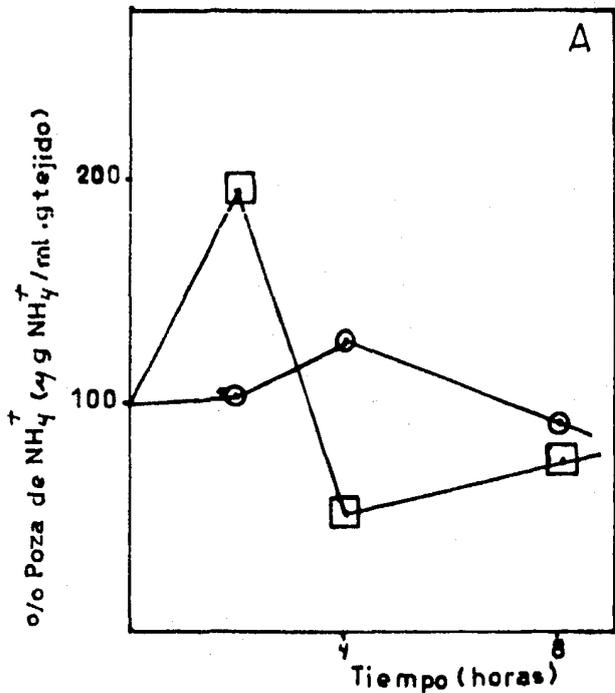


Figura 9.7 En la gráfica A se muestra el % de poza de NH_4^+ para dos extractos: 1: GS, GDH (O) y 2: GOGAT (\square); en la gráfica B se observa el % de poza de NO_3^- para los dos extractos anteriores; todo esto es de extractos hechos con hojas incubadas en una fuente de NH_4^+ 2 mM.

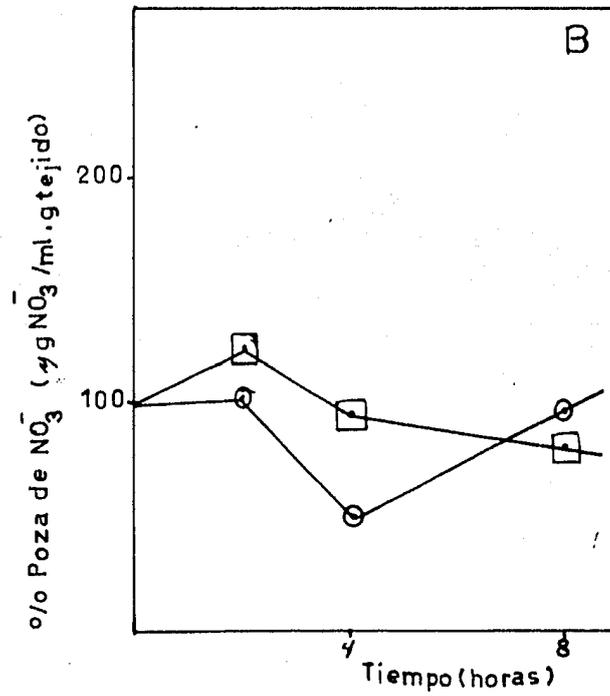
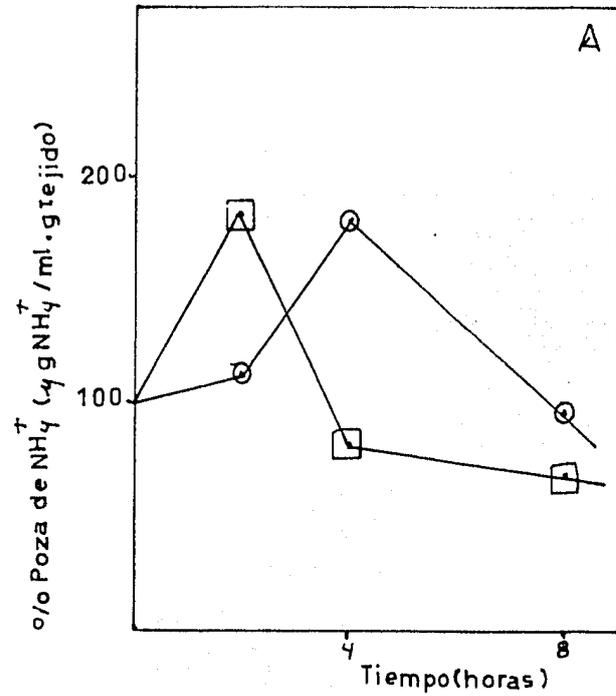


Figura 3.8 En la gráfica A se muestra el % de poza de NH_4^+ para dos extractos : 1.-GS, GDH (○) y 2.-GOGAT (□); en la gráfica B se ve el % de poza de NO_3^- para los extractos anteriores, todo ésto es de extractos hechos con hojas incubadas en una fuente de NO_3^- 20 mM + NH_4^+ 2 mM.

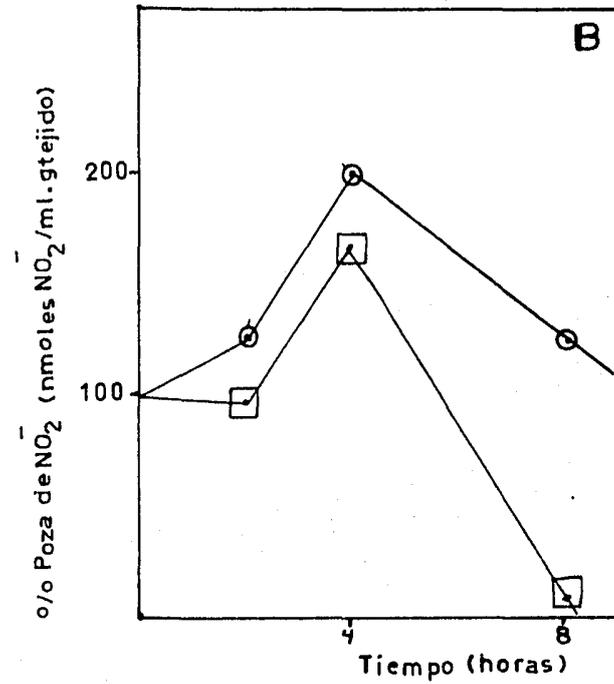
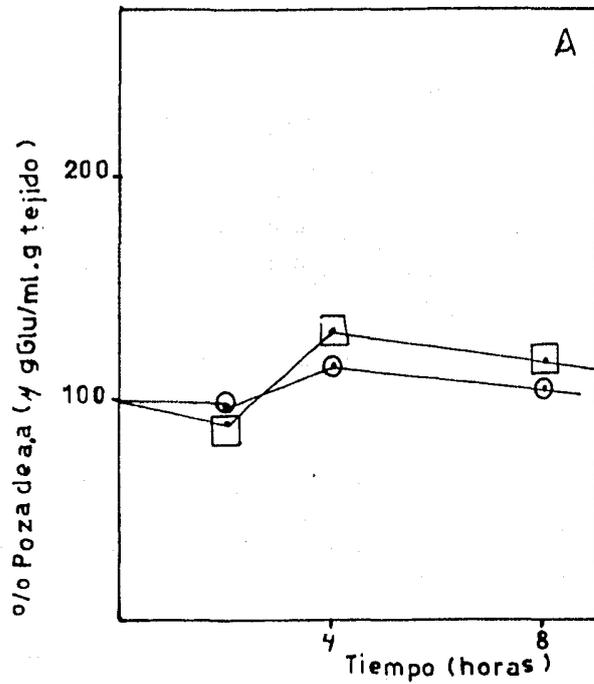


Figura 3.9 En la gráfica A se muestra el % poza de aminoácidos para dos extractos: 1-GS, GDH (○) y 2-GOGAT (□); en la gráfica B se observa el % de la poza de NO_2^- para los extractos anteriores; todo esto es de extractos hechos con hojas incubadas en H_2O sin fuente de nitrógeno.

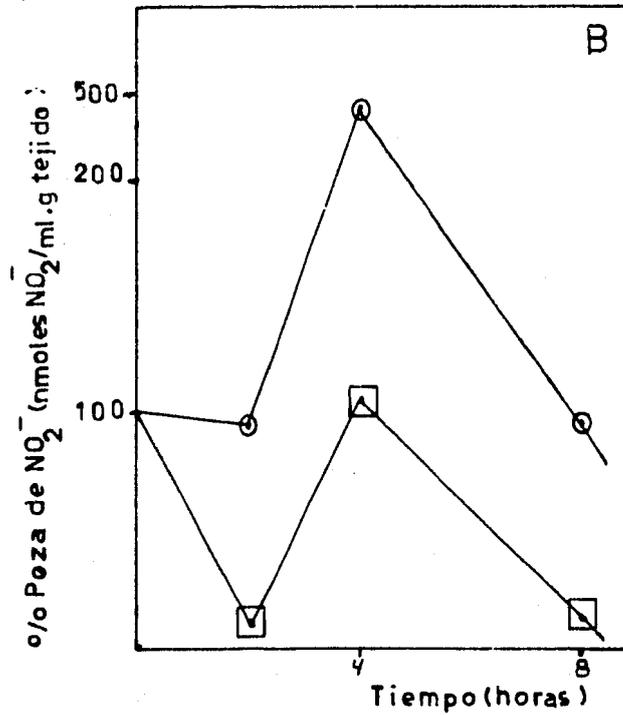
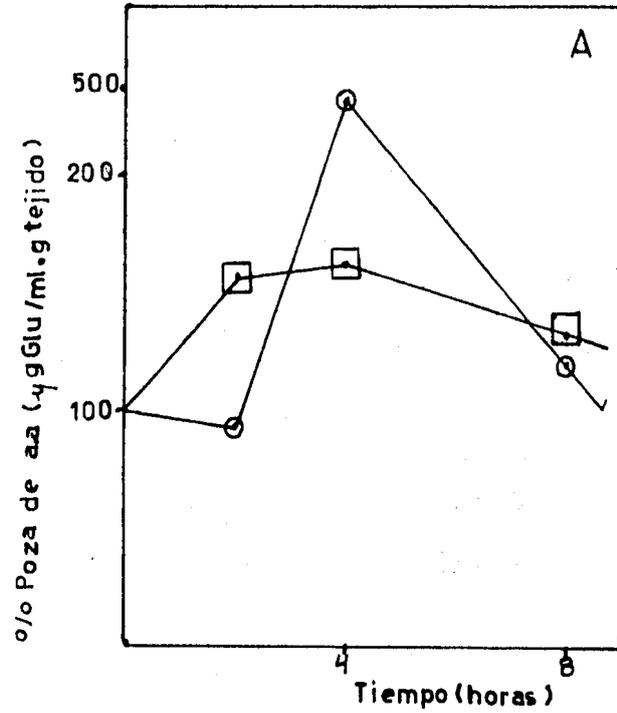


Figura 3.10 En la gráfica A se muestra el % poza de aminoácidos para dos extractos: 1-GS₁GDH (○) y 2-GOGAT (□); en la grafica B esta el % poza de NO_2^- para los dos extractos anteriores; todo ésto es de extractos hechos con hojas incubadas en una fuente de NO_3^- 20mM.

HOJA

Fuente de nitrógeno	% Actividad de la GDH-NADH	% Actividad de la GDH-NAD ⁺	% Actividad de la GS	% Actividad de la GOGAT
H ₂ O	100	100	100	100
NO ₃ ⁻	102.12	79.12	77.53	192.97
NH ₄ ⁺	99.08	102.88	58.47	314.66
NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	106.38	126.57	84.23	589.11

Tabla 3.I La tabla muestra la variación en % de las actividades de las enzimas: GDH, GS y GOGAT de hoja en las diferentes fuentes nitrogenadas: NO₃⁻ 20 mM, NH₄⁺ 2 mM y NO₃⁻ + NH₄⁺ 20 y 2 mM respectivamente.

RAIZ

Fuente de nitrógeno	% Actividad de la GDH-NADH	% Actividad de la GDH-NAD ⁺	% Actividad de la GS	% Actividad de la GOGAT
H ₂ O	100	100	100	100
NO ₃ ⁻	118.63	96.64	540.87	50.22
NH ₄ ⁺	48.36	70.83	247.91	43.50
NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	124.23	187.20	1062.51	205.42

Tabla 3.II La tabla muestra la variación en % de las actividades de las enzimas: GDH, GS y GOGAT de raíz en las diferentes fuentes nitrogenadas: NO₃⁻ 20 mM, NH₄⁺ 2 mM y NO₃⁻ 20 mM + NH₄⁺ 2 mM.

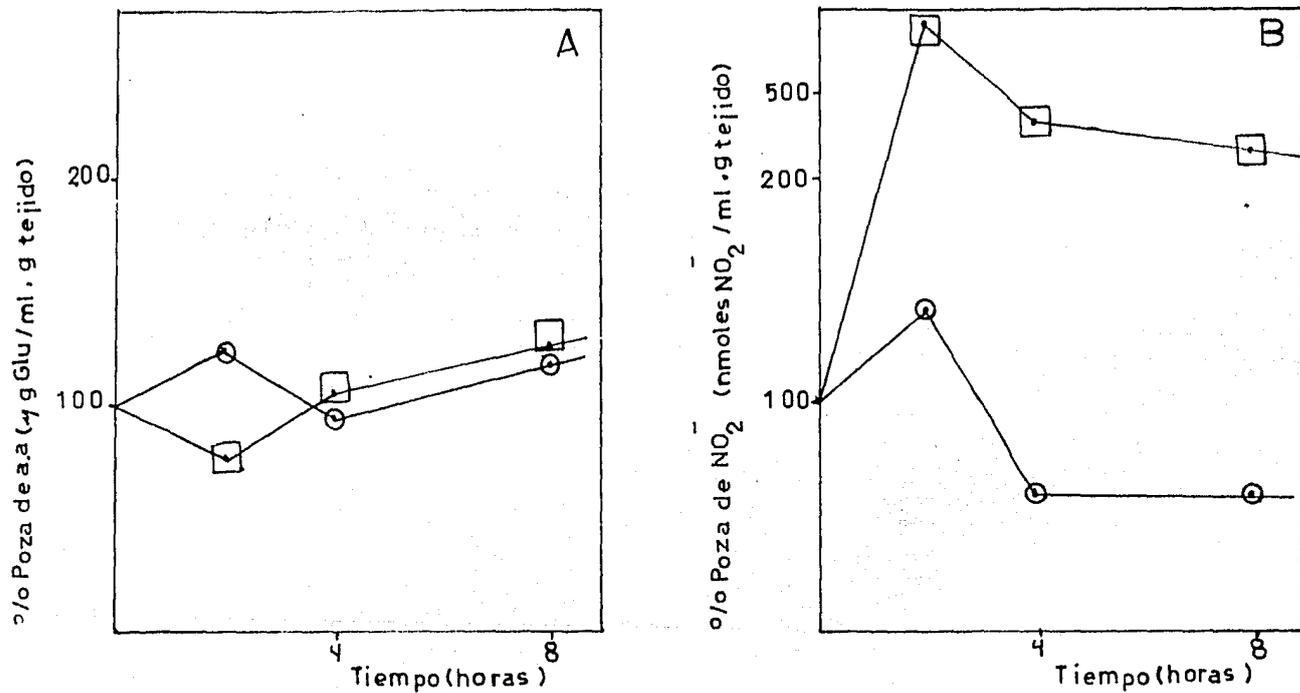


Figura 3.12 En la gráfica A se muestra el % de poza de aminoácidos para dos extractos: 1: GS, GDH (O) y 2: GOGAT (□); en la gráfica B se observa el % de poza de NO₂⁻ para los dos extractos anteriores; todo esto es de extractos hechos con hojas incubadas en una fuente de NO₃⁻ 20 mM + NH₄⁺ 2 mM.

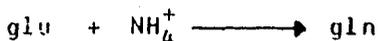
En la fuente de nitratos 20 mM la poza de nitratos presenta una caída al t=8 horas (figura 3.6).

Por último, el aumento que se presenta en las pozas de amonio puede deberse a un posible envejecimiento del tejido al tiempo de 4 horas, por lo que se llevaría a cabo la activación de las proteasas; las proteínas se hidrolizarían hasta aminoácidos y estos hasta amonio lo cual contribuiría enormemente, junto con los factores antes mencionados, a que la actividad de la GDH se viera disminuída, pués es inhibida por un exceso de amonio (31).

III.1.2 Efecto sobre la actividad de la vía GS/GOGAT.

La GS es considerada la enzima responsable para la asimilación primaria de amonio en las plantas superiores (29, 31, 52), esta enzima actúa acoplada con la GOGAT para dicha asimilación.

Lo anterior significa que al actuar la GS, se forma el sustrato sobre el cual actúa la GOGAT; esto se puede ver en las siguientes reacciones:



La gln es uno de los sustratos de la GOGAT al igual que el α KG:



De las gráficas de las figuras: 3.15 y 3.16, que corresponden a las fuentes de amonio 2 mM y nitrato + amonio 20 y 2 mM respectivamente, se observa que la GS se comporta de igual manera en las dos fuentes, mientras que la fuente de nitratos 20 mM (figura 3.14) presenta un comportamiento muy diferente y que es igual al control que es agua (figura 3.13).

El fenómeno anterior se puede interpretar de la siguiente manera: la poza de amonio, en la fuente de nitrato + amonio y en la de amonio, se encuentra bastante elevada principalmente en la de nitrato + amonio (figuras 3.7 y 3.8), y esto es por-

que el nitrato está siendo convertido en amonio por medio de la nitrato y la nitrito reductasa (NR y NiR), ocasionándose que los niveles de amonio aumenten y que la actividad de la GS se incremente en esta fuente de nitrógeno (nitrato + amonio).

Ahora bien si se ve la poza de amonio, de la fuente de nitrato + amonio (figura 3.8), se observa que aumenta hasta el $t=4$ horas el cual es el mismo tiempo en el que se presenta la mayor actividad de la GS en la fuente ya mencionada anteriormente. Después de este tiempo, al $t=8$ horas la actividad de la GS empieza a bajar al igual que la poza de amonio (figura 3.16).

Como se ha mencionado anteriormente la GS es la enzima que actúa principalmente en la asimilación de amonio, en la fuente de amonio y de nitrato + amonio, esto indica que la GS es activa en presencia de amonio. Lo anterior coincide con lo reportado en estudios sobre otros sistemas (24), en los cuales la actividad de la GS se incrementa en presencia de amonio.

En el caso de la fuente de nitrato 20 mM (figura 3.14), en la que la GOGAT presenta una mayor actividad, se observa que su poza de amonio (figura 3.6) al tiempo de 4 horas, muestra un incremento de amonio, el cual coincide con un ligero aumento en la actividad de la GS y además con un marcado incremento en la actividad de la GOGAT.

Lo anterior implica dos cosas: a) la GS es dependiente de amonio y aumenta cuando los niveles de este suben; b) el producto de la acción de la GOGAT es glu, el cual a su vez es el sustrato para la GS y si observamos la figura 3.14 veremos que al tiempo de 4 horas, es cuando la GOGAT presenta su mayor actividad, produciendo glu el cual a su vez es el sustrato para la GS, de lo anterior y de la figura 3.14 se explica el marcado incremento que sufre en su actividad la GS a

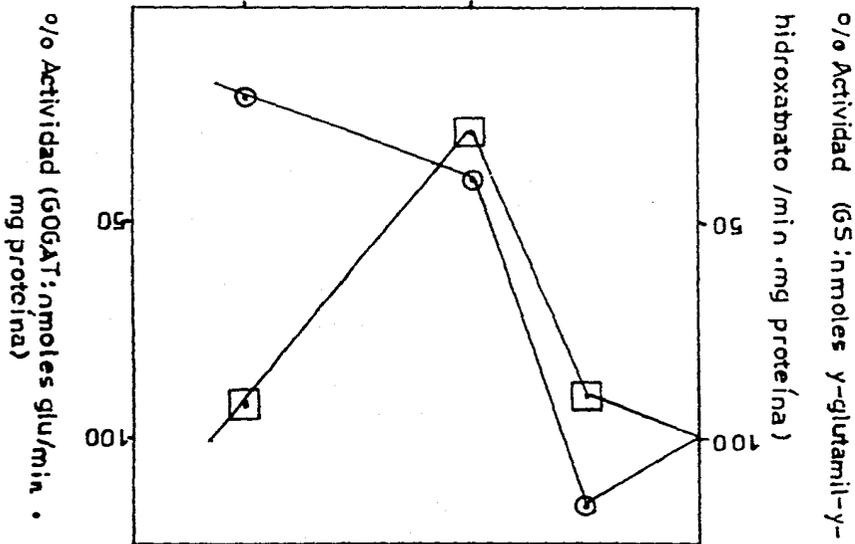
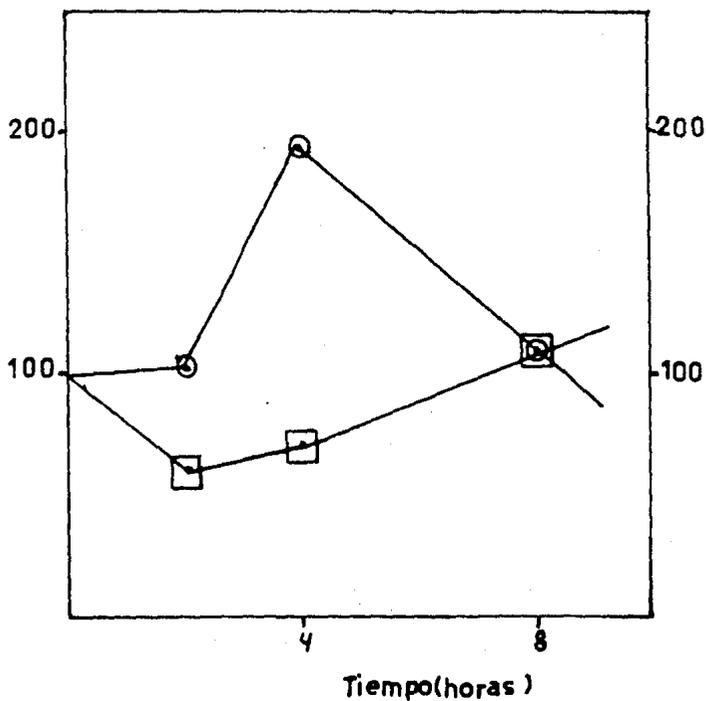


Figura 3.13 Actividad de la GS (□) y la GOGAT (○) en hojas incubadas en H_2O_2 sin fuente de nitrógeno, en iluminación y agitación continua.

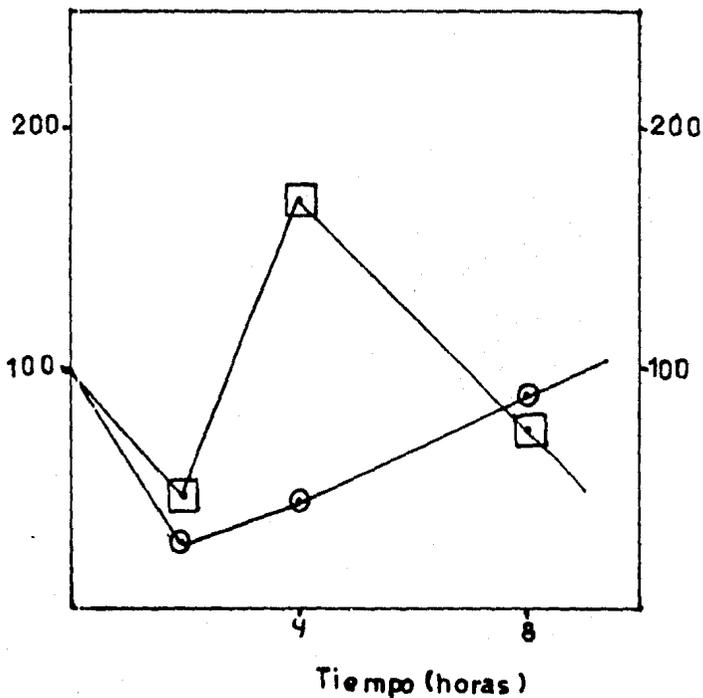
o/o Actividad (GS: nmoles γ -
hidroxamato/min, mg proteína)



o/o Actividad (GOGAT: nmoles Glu/min,
mg proteína)

Figura 3.14 Actividad de la GS (□) y la GOGAT (○), en hojas incubadas en una fuente de NO_3^- 20 mM, con agitación e iluminación continua.

% Actividad (GS; nmoles γ -glutamil- γ -hidroxamato/min. mg proteína)



% Actividad (GOGAT; nmoles Glu/min. mg proteína)

Figura 3.15 Actividad de la GS(□) y de la GOGAT(O), en hojas incubadas en una fuente de NH_4^+ 2 mM, con agitación e iluminación continua.

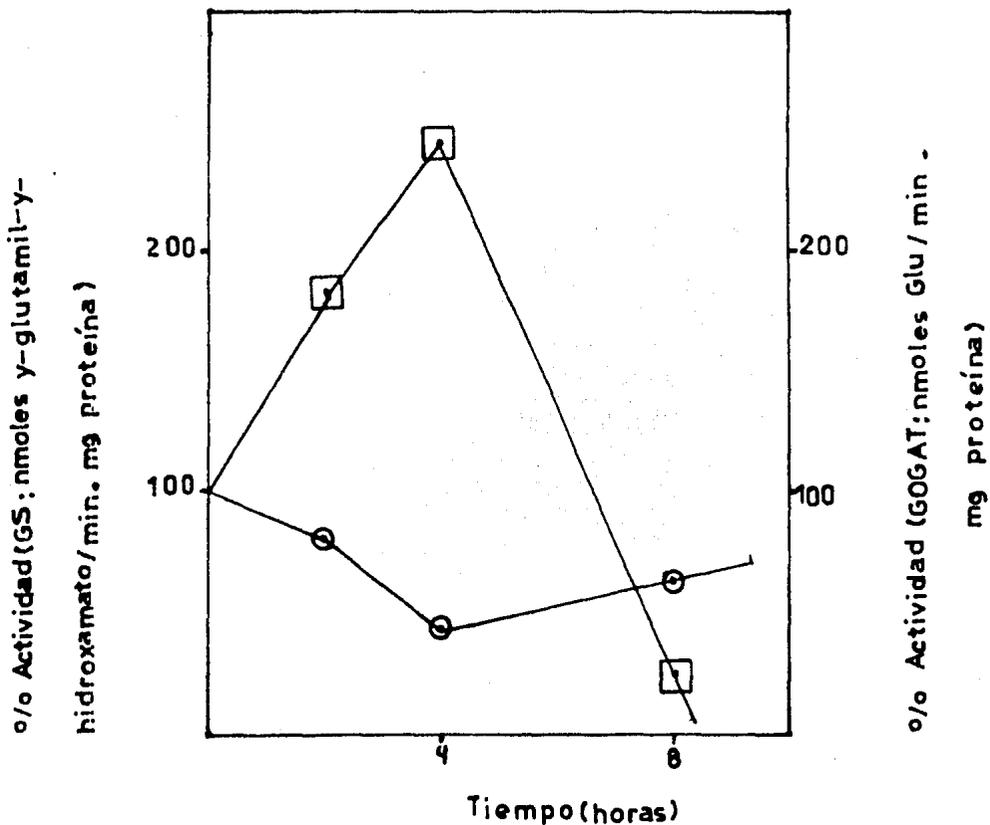


Figura 3.16 Actividad de la GS (□) y de la GOGAT (○), en hojas incubadas en una fuente de NO_3^- 20 mM + NH_4^+ 2 mM, con agitación e iluminación continua.

las 8 horas; formándose de esta manera el ciclo GS/GOGAT.

Como se ha visto a través de los resultados anteriores la vía de asimilación del amonio a través de la vía GS/GOGAT es compleja, y su complejidad consiste en un acoplamiento de ambas enzimas, esto es que su funcionamiento se basa en acumulación de sustrato ya sea para la GS o para la GOGAT; como se ha mencionado anteriormente la GS produce glu el cual es sustrato para la GOGAT la cual a su vez produce glu el cual es sustrato para la GS formandose así el ciclo GS/GOGAT.

III.2 EFECTO DE LA FUENTE NITROGENADA EN LA ACTIVIDAD DE GS, GDH Y GOGAT EN PLANTAS DE CATHARANTHUS ROSEUS L.

III.2.1 Efecto sobre la actividad de la GDH.

Se llevó a cabo un estudio comparativo entre hojas y raíces de C. roseus, del comportamiento de la GDH, GS y GOGAT en diferentes fuentes nitrogenadas, en las tablas 3.I y 3.II se observan estas comparaciones.

Como se puede ver en las tablas 3.I y 3.II, la actividad de la GDH aminativa (GDH-NADH) en hojas no sufre modificación en ninguna de las fuentes nitrogenadas, ya que los pocos incrementos que se observan en la fuente de nitrato 20 mM y en la de nitrato + amonio (20 y 2 mM), se pueden considerar no significativos.

En raíz sucede todo lo contrario, ya que la actividad de la GDH-NADH si se ve modificada por las diferentes fuentes nitrogenadas, la mayor actividad de la GDH-NADH en raíz se presenta en la fuente de nitrato + amonio 20 y 2 mM respectivamente.

Los resultados anteriores, los cuales muestran una predominancia de la GDH-NADH en raíz, sugieren que este órgano es el principal sitio de asimilación de amonio en plántulas de C. roseus.

Por otra parte la actividad de la GDH-NAD⁺ sí presenta modificaciones tanto en hoja como en raíz, los mayores porcentajes de actividad de la GDH desaminativa los presenta la fuente de nitrato + amonio (20 y 2 mM), en hoja y en raíz, presentándose en raíz la actividad más alta: este incremento en la actividad de la GDH-NAD⁺ indica que el contenido de glu es bastante alto ya que este es el sustrato de la GDH-NAD⁺, este contenido es alto tanto en hoja como en raíz en la fuente de nitrato + amonio.

En la fuente de amonio 2 mM, la actividad de la GDH-NAD⁺ en raíz (tabla 3.II), baja con respecto al control que es agua esto se debe a que el amonio a esta concentración (2mM) inhibe fuertemente la actividad desaminativa indicando la posibilidad de que este ión a muy bajas concentraciones sea transportado por el xilema hasta la hoja y es por esto que en hoja se observa un incremento en la actividad de la GDH-NAD⁺.

Estos resultados coinciden con otros reportados por Loyola (31).

Por último al comparar la actividad tanto de la GDH aminativa (GDH-NADH) como de la GDH desaminativa (GDH-NAD⁺), se observa (tablas 3.I y 3.II) que no se comportan de igual manera, esto sugiere que existe una regulación diferencial entre las dos actividades es decir bajo la misma condición la actividad desaminativa (GDH-NAD⁺) se comporta diferente a la aminativa (GDH-NADH).

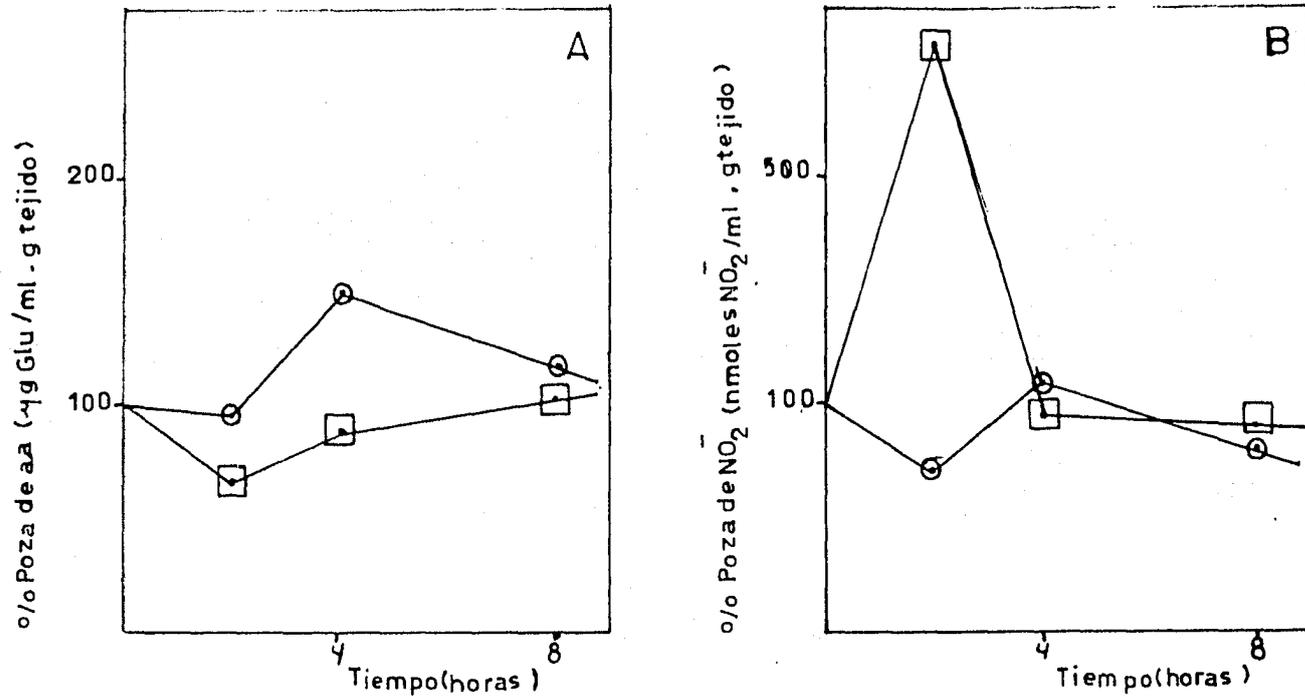


Figura 3.11 En la gráfica A se muestra el % de poza de aminoácidos para dos extractos: 1-GS, GDH (O) y 2-GOGAT (□); en la gráfica B se observa el % de poza de NO₂⁻ para los dos extractos anteriores; todo es de extractos hechos con hojas incubadas en una fuente de NH₄⁺ 2mM.

III.2.2 Efecto de la fuente nitrogenada sobre la actividad de la vía GS/GOGAT.

Al comparar los resultados entre las hojas y raíces, se observa (tablas 3.I y 3.II) que la GS y la GOGAT no se comportan de manera similar en ninguna de las fuentes nitrogenadas, mientras que las mayores actividades de GS se presentan en raíz, en hoja la actividad de la GS baja mucho con respecto al control que es agua.

En la fuente de nitratos 20 mM, la actividad de la GS en hoja es baja con respecto al control (agua), esto sugiere que el nitrato es asimilado en la raíz, en donde la actividad de la GS es muy elevada lo que sugiere a su vez que gln es la forma de transporte del nitrógeno en Catharanthus roseus, ya que a su vez la actividad de la GOGAT se encuentra muy baja en raíz y elevada en hoja, en donde estaría convirtiendo gln en glu para los procesos de biosíntesis de aminoácidos.

Como se ve en las tablas 3.I y 3.II, en la fuente de amonio 2 mM y en la de nitrato + amonio 20 y 2 mM respectivamente, se observa que la actividad de la GS en hojas bajo con respecto al control (agua), estos resultados de inhibición de la GS por amonio en hojas sugieren que el amonio que no alcanza a ser asimilado en raíz puede ser transportado a través del xilema hasta las hojas, este amonio es el responsable de la inhibición de la GS. Lo que podría suceder en realidad es que el amonio disminuyera la disponibilidad de ATP para el funcionamiento de la GS, por desacoplamiento de la fotofosforilación (31).

La gln formada por la GS en raíz, no incrementa la actividad de la GOGAT-NADH en raíz, ya que esta glutamina es translocada al xilema y llevada a las hojas en donde por medio de la GOGAT-Fd es transformada en glutámico.

Si bien el comportamiento de las enzimas varía un poco dependiendo de la fuente nitrogenada, el modelo propuesto en la figura 3.17, explica el comportamiento en todas ellas y sugiere:

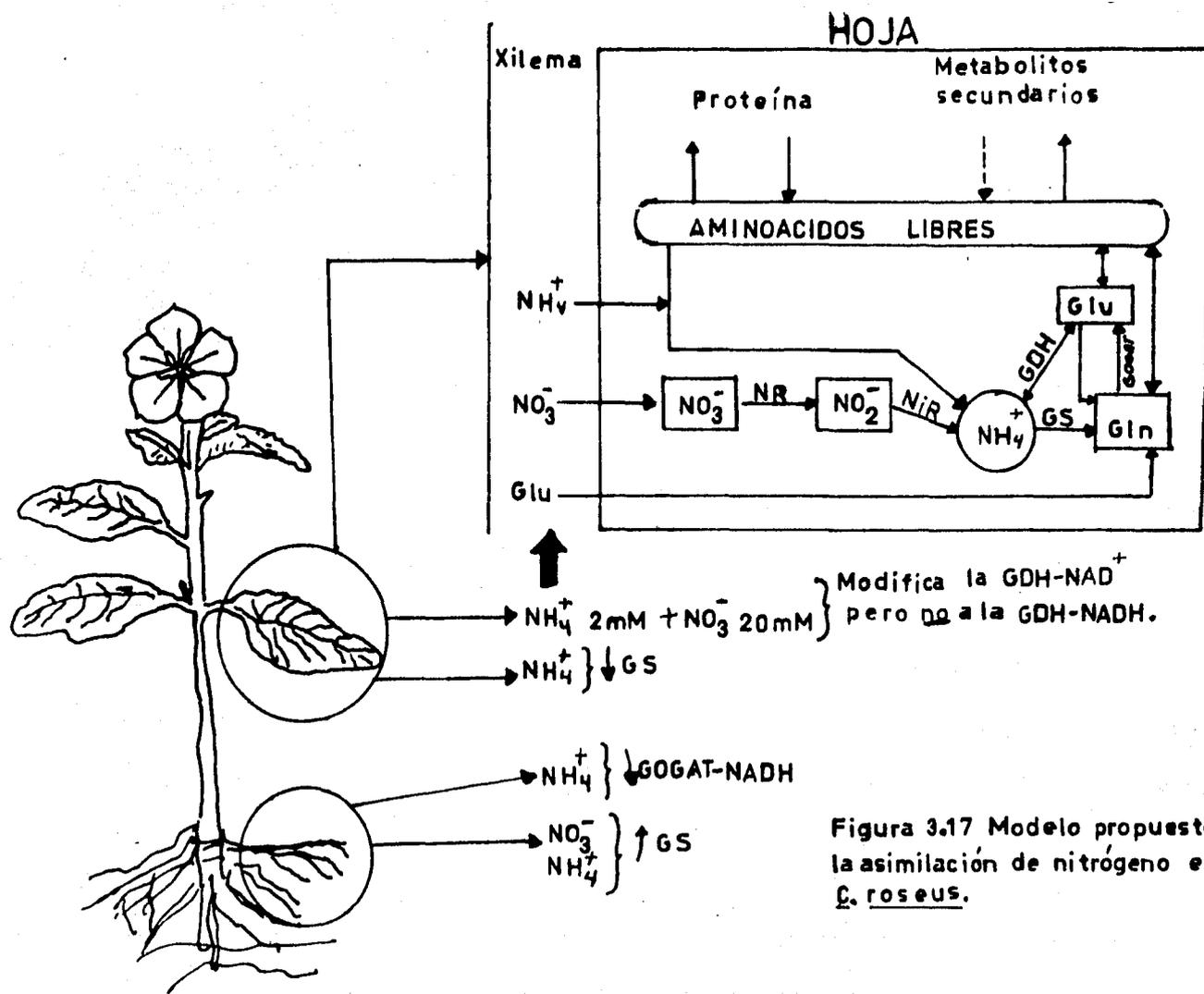


Figura 3.17 Modelo propuesto para la asimilación de nitrógeno en *C. roseus*.

- a) el nitrógeno inorgánico es asimilado en raíz y se transporta como gln a las hojas b) la vía de asimilación de dicho nitrógeno es la GS/GOGAT.

III.3 EFECTO DE LA FUENTE NITROGENADA EN EL CONTENIDO DE ALCALOIDES.

Se germinaron semillas de C. roseus en tierra, se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad constante, a los 5 meses las plantas fueron regadas con las diferentes fuentes nitrogenadas durante un mes más. Al término de este plazo se cortaron las hojas en las cuales se determinó alcaloides totales teniendo como control plantas regadas con agua solamente.

El rendimiento en por ciento comparado con el control, se puede observar en la tabla 3.III.

Al observar las plantas en su aspecto físico, se vió que en la fuente de nitratos 20 mM. las plantas crecieron más que en amonio 2 mM y que en nitrato + amonio (20 y 2 mM), estas dos últimas presentaron un crecimiento similar entre si pero mayor en comparación al control que fue agua.

Las plantas de la fuente de nitratos medían aproximadamente 35-40 cm; las de la fuente de amonio y de nitratos + amonio medían de 25-30 cm y las plantas control (agua) medían de 20-25 cm.

Al hacer la extracción de los alcaloides y la cuantificación total, se vió que en la fuente de nitratos 20 mM era donde se presentaba el mayor contenido de alcaloides, seguido de la fuente de amonio 2 mM.

Este alto contenido de alcaloides en la fuente de nitratos se puede deber a lo siguiente:
el nitrato esta siendo asimilado en raíz por medio de la GS, esta a su vez da como producto glutamina (gln), esta gln tiene

Fuente de nitrógeno	Alcaloides totales (g)	Rendimiento en %
H ₂ O	0.62	100
NO ₃ ⁻	0.91	146.77
NH ₄ ⁺	0.72	116.12
NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	0.35	56.45

Tabla 3.III En la tabla se muestra la variación en % del contenido de alcaloides de C. roseus con respecto a la fuente de nitrógeno: NO₃⁻ 20mM, NH₄⁺ 2mM y NO₃⁻ 20mM + NH₄⁺ 2mM, teniendo H₂O como blanco.

La cantidad de hojas con la que se llevo a cabo la extracción de alcaloides, fue de 8 g en todos los casos.

un grupo amido el cual va a formar parte del anillo indólico del triptofano, el cual es el precursor para la síntesis de alcaloides de C. roseus.

En la fuente de nitratos + amonio el contenido de alcaloides está muy por debajo del control (agua), esto se puede deber a que hay amonio en exceso y esto tal vez inhibe de alguna manera la síntesis de alcaloides.

Todos estos resultados, no son más que el inicio de una serie de experimentos a seguir con otras fuentes nitrogenadas a otras concentraciones; además de estudiar también todas las enzimas que intervienen en la biosíntesis de estos alcaloides principalmente la triptofano sintetasa de la cual se conoce muy poco y que tal vez pueda darnos más información sobre la biosíntesis de los alcaloides mencionados, ya que puede estar jugando un papel clave en dicha biosíntesis.

IV CONCLUSIONES

En base a los objetivos de este trabajo, las conclusiones son:

- 1.- La fuente de nitrógeno influye notablemente en el metabolismo nitrogenado de Catharanthus roseus, observándose que la vía de asimilación del nitrógeno inorgánico en esta planta es la GS/GOGAT.
- 2.- El nitrógeno inorgánico es asimilado en raíz y se transporta como gln a las hojas.
- 3.- La fuente de nitrógeno presenta un efecto notorio en el contenido de alcaloides, presentándose el mayor contenido en la fuente de nitratos 20 mM.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alekhina, N.D. and Kenzhebaeva, S.J. (1977) Investigation of glutamine synthetase activity in plant roots in connection with the cultivation temperature. *Soviet Plant Physiology* 6: 910-914
- 2.- Arima, Y. and Kumazawa, K. (1977) Evidence of ammonium assimilation via glutamine synthetase-glutamate synthase system in rice seedling roots. *Plant Cell Physiology* 18: 1121-1129
- 3.- Arima, Y. (1978) Glutamate synthase in rice root extracts and the relationship among electron donors, nitrogen donors and its activity. *Plant Cell Physiology* 6: 955-961
- 4.- Barratt, D.H.P (1980) Method for the detection of glutamine synthetase activity on starch gels. *Plant Science Letters* 18: 249-255
- 5.- Barratt, D.H.P. (1981) Identification of multiple forms of glutamine synthetase in field bean (*Vicia faba* L.). *Plant Science Letters* 20: 273-279
- 6.- Beevers, L. and Storey, R. (1976) Glutamate synthetase in developing cotyledons of *Pisum sativum*. *Plant Physiology* 57: 882-886
- 7.- Brunetti, N. and Hagemann, H. (1976) Comparison of *in vivo* and *in vitro* assays of nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *Plant Physiol.* 58: 583-587
- 8.- Canvin, D.T. and Atkins, C.A. (1974) Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves: effect of light, carbon dioxide and oxygen. *Plant* 116: 207-224
- 9.- Cocking, E.C. and Yenm, E.W. (1954) Estimation of amino-acids by ninhidrin. *Bioch. J.* 58: XII
- 10.- Elliot, W.A. (1951) Studies on the enzymic synthesis of glutamine. *Biochem. Jour.* 49: 106-112
- 11.- Givan, C.V. (1975) Light-dependent synthesis of glutamine in Pea-chloroplast preparations. *Planta* 122: 281-291
- 12.- Goodman, L.S. and Guilman, A. (1978) Bases farmacológicas de la terapéutica. Quinta edición Ed. Interamericana

- 13.- Gromyko, E.A. and Moshkina, L.G. (1978) Dynamics of glutamine synthetase activity during the process of vegetation in bean. *Soviet Plant Physiology* 25: 286-289
- 14.- Guiz, C.; Hirel, B. and Gadal, P. (1979) Occurrence and influence of light on the relative proportions of two glutamine synthetases in rice leaves. *Plant Science Letters* 15: 271-277
- 15.- Hajime, M.; Hans, N. and Scott, I. (1979) Purification and properties of strictosidine synthetase from Catharanthus roseus cultured cells. *Biochemistry* 18: 3760-3763
- 16.- Harel, E.; Lea, P.J. and Mifflin, B.J. (1977) The localization of enzymes of nitrogen assimilation in maize leaves and their activities during greening. *Planta* 134: 195-200
- 17.- Haystead, A. (1973) Glutamine synthetase in the chloroplasts of Vicia faba. *Planta* 111: 271-272
- 18.- Hirel, B. and Gadal, P. (1980) Glutamine synthetase from rice. *Plant Physiology* 66: 619-623
- 19.- Jara, R.S. (1981) *Vinca rosea*, su posible interés farmacéutico revisión bibliográfica 1970-79. Tesis de licenciatura en Química (Q.F.B.) Facultad de Química
- 20.- Joy, K.W. (1973) Control of glutamate dehydrogenase from Pisum sativum roots. *Phytochem.*, 12: 1031-1040
- 21.- Kanamori, T. and Matsumoto, H. (1972) Glutamine synthetase from rice plant roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 404-412
- 22.- Kanamori, T. and Matsumoto, H. (1972) Glutamine synthetase from rice plant roots. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 400-412
- 23.- Keys, A.J.; Lea, P.J. and Mifflin, B.J. (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature (London)* 275: 741-743
- 24.- Kretovich, L.W. ; Eustigneiva, G.Z. and Dzhokharidze, Z. (1981) Two forms of glutamine synthetase in leaves of Cucurbita pepo. *Phytochemistry* 20: 625-629
- 25.- Kunkel, L.O. (1941) Heat cure of aster yellows in periwinkles. *Amer. J. Bot.*, 28: 761-769
- 26.- Kutney, P.J. and Lewis, S.L. (1980) Alkaloids production in Catharanthus roseus cell cultures: isolation and characterization of alkaloids from one cell line. *Phytochem.*, 19: 2589-2595

- 27.- Lea, P.J. and Mifflin, B.J. (1974) Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature (London)* 251: 614-616
- 28.- Lee, S.L.; Hirata, T. and Scott, A.I. (1979) Indole alkaloid biosynthesis in Catharanthus roseus involvement of geissoschizine and 19-epiajmalicine. *Tetrahedron Letters* 8: 691-695
- 29.- Loyola, V.V.M.; Sánchez, E. y Murillo, G.E. (1981) El metabolismo del nitrógeno en las plantas. *Naturaleza* 2: 112
- 30.- Loyola, V.V.M. (1983) La fijación del nitrógeno. *Boletín de educación bioquímica.* 2: 16-23
- 31.- Loyola, V.V.M (1983) Metabolismo nitrogenado en maíz. Tesis de Doctorado. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. UNAM.
- 32.- Mann, A.F. and Stewart, G.R. (1979) Identification of two forms of glutamine synthetase in barley (Hordeum vulgare).
- 33.- Match, T.; Takashashi, E. and Ida, J. (1979) Glutamate synthetase in developing pea cotyledons: occurrence of NADH-dependent and ferredoxin-dependent enzymes. *Plant Cell Physiology* 20: 1455-1459
- 34.- Match, T. and Takashashi, E. (1980) A rapid and sensitive assay for ferredoxin-glutamate synthase. *Bull. Res. Int. Food Sci.*, 43: 1-6
- 35.- Match, T. and Takashashi, E. (1982) Changes in the activities of ferredoxin and NADH glutamate synthase during seedling development of peas. *Planta* 154: 289-294
- 36.- Mifflin, B.J. and Lea, P.J. (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochem.*, 15: 873-885
- 37.- Mitchell, G.H. and Stocking, C.R. (1975) Kinetics and energetics of life-driven chloroplast glutamine synthesis. *Plant Physiology* 55: 59-63
- 38.- Naven, W. and Hartmann, T. (1980) Glutamate dehydrogenase from Pisum sativum L. Localization of the multiple forms of glutamate formation in isolated mitochondria. *Planta* 148: 7-16
- 39.- Nicholas, D.J. and Hason, A.C. (1971) Determination of nitrate and nitrite. *Methods of Enzymology* 23: 491-503
- 40.- Noble, R.L. (1963) Anticancer alkaloids of vinca rosea. Proc. 2nd. Internat. Pharm. Cong. Prague Pergamon Press.

- 41.- Oaks, A.; Jones, K. and Misra, S. (1979) A comparison of glutamate synthase obtained from maize endosperms and roots Plant Physiology 63: 793-795
- 42.- Oaks, A.; Stulen, I.; Jones, K. and Misra, S. (1980) Enzymes of nitrogen assimilation in maize roots. Planta 148: 477-484
- 43.- Oji, Y. and Izawa, G. (1971) Rapid synthesis of glutamine during the initial period of ammonia assimilation in roots of barley plants. Plant Cell Physiology 12: 817-821
- 44.- O'Neal, D. and Joy, K.W. (1973) Glutamine synthetase of pea leaves I. purification, stabilization and pH optima. Arch. Biochem. Biophys. 159: 113-122
- 45.- O'Neal, D. and Joy, K.W. (1974) Glutamine synthetase of pea leaves. Plant Physiology 54: 773-779
- 46.- Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. Analytical Biochem., 83: 346- 356
- 47.- Radin, J. (1975) Differential regulation of nitrate reductase induction in roots and shoots of cotton plants. Plant Physiology 55: 178-182
- 48.- Rathman, C.K.M. and Edwards, G.E. (1976) Distribution of nitrate-assimilating enzymes between mesophyll-protoplasts and bundle sheath cells in leaves of three groups of C₄ plants. Plant Physiology 57: 881-885
- 49.- Rhodes, D.; Rendon, G.A. and Stewart, G.R. (1976) The regulation of ammonia assimilating enzymes in Lemma minor. Planta 129: 203-210
- 50.- Rosenstein, E. (1982) Diccionario de especialidades farmacéuticas. 28a. edición mexicana pp 697, 977
- 51.- Shrader, I.E.; Carald, D.A. and Poherson, D.M. (1974) Use of protein in extraction and stabilization of nitrate reductase. Plant Physiology 53: 688-690
- 52.- Scott, D.B. and Neyra, C.A. (1979) Glutamine synthetase and nitrate assimilation in sorghum (Sorghum vulgare) leaves. Can. J. Bot., 57: 754-758
- 53.- Smith, F.W. and Thompson, J.F. (1971) Regulation of nitrate reductase in excised barley roots. Plant Physiology 48: 219-223

- 54.- Stöckigt, J.; Husson, H.P. and Zenk, M.H. (1977) Cathenamina, a central intermediate in the cell free biosynthesis of ajmalicine and related indole alkaloids. *J. Chem. Soc. Common* 164: 166
- 55.- Stöckigt, J. and Zenk, M.H. (1977) Isovincoside (strictosidine) the key intermediate in the enzymatic formation of indole alkaloids. *FEBS Letters* 79
- 56.- Storey, R. and Reporter, M. (1978) Aminoacid metabolism in developing soybeans (*Glycine max*): glutamate synthase in the cotyledons. *Can. J. Bot.*, 56: 1349-1356
- 57.- Strelt, R. and Averell, P.R. (1970) Analytical chemistry of N and its compounds. Parte I, Wiley 28 Interscience New York pp 55
- 58.- Stuart, K.L. and Honda, T. (1978) Studies on the biosynthesis of basindole alkaloids. The final stages in biosynthesis of vinblastine, leurosine and catharine. *Heterocycles* 9: 1391-1395
- 59.- Susuki, A. and Gadal, P. (1982) Glutamate synthase from rice leaves. *Plant Physiology* 69: 848-852
- 60.- Svoboda, G.H.; Thornton, A. and Bedwell, D.B. (1963) Alkaloids of vinca rosea (*Catharanthus roseus*). Extraction and characterization of root alkaloids. *Lloydia* 26: 141
- 61.- Takanashi, Y. and Furhashi, K. (1983) Properties of glutamate dehydrogenase purified from green tobacco callus tissue. *Plant Cell Physiology* 21: 1067-1075
- 62.- Taylor, W.I. and Farnsworth, N.R. (1973) The *Catharanthus* alkaloids, Botany, Chemistry and Pharmacology. Marcel Becker New York
- 63.- Tempest, D.D.; Meers, J.L. and Brown, C.M. (1970) Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a nither to un know
- 64.- Varner, J.E. and Webster, G.L. (1955) Studies on the enzymatic synthesis of glutamine. *Plant Physiology* 30: 393
- 65.- Varner, J.E. (1960) The optical specificity of glutamine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 90: 7-11
- 66.- Waizel, B.J. (1979) Cultivo, aislamiento y variación de principios activos de tres especies de plantas con propiedades anticarcinógenicas. Tesis de licenciatura Q.F.B

- 67.- Waller, G.R. and Deirmer, D.E. (1981) Enzymology of alkaloid metabolism in plants and microorganisms, in the biochemistry of plants. Acad. Press Inc., NY 7: 371-381
- 68.- Wallsgrave, R.M.; Harel, E. and Mifflin, B.J. (1977) Studies on glutamate synthetase from the leaves on higer plants. J. Exp. Bot., 104: 588-592
- 69.- Wallsgrave, R.M.; Lea, P.J. and Mifflin, B.J. (1979) Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. Plant Physiology 65: 232-236
- 70.- Wallsgrave, R.M.; Lea, P.J. and Mifflin, B.J. (1982) The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. Planta 154: 473-476
- 71.- Webster, C.G. (1953) Enzymatic synthesis of glutamine in higer plants. Plant Physiology 44: 453-457
- 72.- Yamasaky, K. and Susuki, Y. (1969) Some properties of glutamate dehydrogenase from pea seedligs. Phytochem., 8: 963-969
- 73.- Yue, S.B. (1969) Isoenzymes of glutamate dehydrogenase in plants. Plant Physiology 44: 435- 437
- 74.- Zeleneva, I.V. and Khavkina, E.E. (1980) Rearragement of enzyme patterns in maize callus and suspension cultures. Planta 148: 105-115
- 75.- Zenk, M.H.; Husson, H.P. and Kanfan, C. (1977) Cathenamine. J.C.S. Chem Comn ., 164
- 76.- Zenk, M.H. (1978) The impact of plant cell culture on industry. Proc. 4th Int. Cong of plant tissue culture (T. Thorpe, eds.), University of Calgary, Albarta Can., Aug 78