

El proceso de biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en plantas del género *Argemone*: una revisión

Angelica Torres-Venegas¹, Aurora Juárez-Landa¹, Juana F. Razo-Saavedra¹, Ana I. Mireles-Arriaga², Jesús Hernández-Ruiz^{2*}.

¹Alumno, Licenciatura en Agronegocios, Departamento de Agronomía, DICIVA, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato.

²Profesor, Departamento de Agronomía, DICIVA, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato.

hernandez.jesus@ugto.mx^{2*}

ana.mireles@ugto.mx^{2*}

Resumen

Las plantas del género de *Argemone* poseen diversos alcaloides bencilisoquinolínicos. Por lo que, la mayoría de las investigaciones se enfoca a estudios de determinación de fitoquímicos y bioensayos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión bibliográfica sobre el proceso de biosíntesis de los compuestos mayoritarios berberina y sanguinarina en plantas del género *Argemone*. Mediante una búsqueda sistemática, se utilizaron las palabras claves (biosynthesis, argemone, berberina, sanguinarina). Se registró un total de 829 investigaciones de berberina de las cuales el 30% se enfoca a la descripción de la biosíntesis. En relación con sanguinarina se registraron 619 investigaciones, de las cuales el 29% se enfoca a su biosíntesis. Existe suficiente información sobre el proceso de biosíntesis, de los compuestos mayoritarios, sin embargo, no está definido si las diferentes etapas de la ruta de síntesis de estos dos alcaloides ocurren en distintos sitios o tiempos o bien existe un mecanismo de transporte de alcaloides entre los tejidos aéreos y las raíces.

Palabras clave: berberina, sanguinarina, ruta de síntesis.

Introducción

Un proceso bioquímico importante que se lleva a cabo en las plantas es la producción de metabolitos secundarios. Los cuales intervienen en las interacciones ecológicas de la planta que pueden cumplir funciones como defensa contra predadores, patógenos o confiriéndoles ventaja sobre otras especies que compiten por los nutrientes del medio (Jan et al., 2021). Los metabolitos secundarios son usualmente clasificados de acuerdo a su origen biosintético, considerado tres familias principales: fenoles, terpenos, y alcaloides (Harborne, 1999). Estos últimos, tienen una distribución restringida en el reino vegetal, ya que son mucho más específicos para una familia, géneros y en algunos casos, para una sola especie (Dixon, 2001).

Las plantas del género *Argemone* producen varios alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI), algunos, pueden ser tóxicos, debido a sus efectos sobre el sistema nervioso central, que provocan pérdida de coordinación, somnolencia y convulsiones (Ziegler & Facchini, 2008). Los ABI más frecuentes entre las especies del género *Argemone* son berberina, sanguinarina y argemonina, sin embargo, existen reportes de más de 45 alcaloides que son sintetizados en los órganos de plantas *Argemone* (Brahmachari et al., 2013; Hernández-Ruiz et al., 2020).

Los alcaloides son de gran interés en la industria, la cual, busca su aprovechamiento comercial (García y Carril, 2011). Sin embargo, uno de los primeros pasos para iniciar su utilización es conocer información sobre las rutas de regulación y biosíntesis en las plantas. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión bibliográfica para conocer el proceso de biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos berberina (protoberberina) y la sanguinarina (benzofenatridina) en plantas del género *Argemone*.

Metodología

Se llevó a cabo una búsqueda en las principales bases de datos disponibles de la Universidad de Guanajuato (Science Direct, Springerlink, Taylor & Francis y Scholar Google) en artículos de investigación, libros y patentes. La revisión sistemática de la literatura se basó en los siguientes conceptos español/ingles.

El nombre de los alcaloides de tipo bencilisoquinolínicos (ABIs) que se encuentran en mayor cantidad en las plantas del género argemone "berberina/berberine", "sanguinarina/sanguinarine". Seguido del operador booleano [AND] con la palabra "biosíntesis/biosynthesis" y el operador de proximidad [WIHT] "Argemone" como principal criterio para localizar registros que utilizaran en una frase todos los términos especificados.

El periodo de búsqueda para berberina contemplo del año de 1975 a 2022, y para sanguinarina del año de 1986 a 2022, considerando como fecha inicial su reporte formal en una fuente documental, consultable (Hahn & Ciak, 1975; Hanaoka et al., 1986).

Resultados

Los estudios relacionados con la biosíntesis de alcaloides en las plantas del género Argemone, de manera general se pueden abordar cinco grandes temáticas (Tabla 1);

- i. Estudios fitoquímicos y metabolómicos los cuales se enfocan a determinar la presencia, identificación y cuantificación de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal.
- ii. Investigaciones moleculares se enfocan al análisis de los genes que contribuyen en la generación de los transcritos correspondientes para la biosíntesis de los alcaloides; sanguinarina y berberina o bien en la expresión diferencial de genes que codifican para las enzimas implicadas en etapas iniciales e intermedias de la ruta biosintética.
- iii. Bioensayos, donde se evalúan los efectos de berberina y sanguinarina en enfermedades, microorganismos
- iv. Análisis de biosíntesis que abordan las reacciones iniciales de la síntesis de los ABIs, pasando de la formación de la reticulina a partir de la norcoclorina, la Síntesis de benzofenantridinas y protoberberinas, hasta las reacciones finales de la biosíntesis de berberina y sanguinarina.
- v. Revisiones de literatura, trabajos que analizan y discuten información de los alcaloides bencilisoquinolínicos en diferentes áreas de la ciencia como medicina, química y biología.

Tabla 1. Numero de investigaciones enfocados al proceso de biosíntesis de berberina y sanguinarina en plantas del género Argemone.

Palabras clave	Fitoquímicos y metabolómicos	Moleculares	Bioensayos	Biosíntesis	Revisiones	Nº	Total
berberine [AND] biosíntesis [WITH] Argemone	265	44	240	249	31	829	
sanguinarine [AND] biosíntesis [WIHT] Argemone	254	74	185	88	18	619	

La revisión de literatura indica que en el inicio de la ruta de biosíntesis de los ABIs se puede resumir en dos etapas (Figura 1) la primera implica la descarboxilación de la tirosina para producir tiramina, esta reacción es llevada a cabo por la tirosinadecarboxilasa (TYDC). La tiramina es convertida en dopamina por acción de la monofenoloxidasas (MFO). Otra molécula de tiramina es convertida en 4-hidroxifenil acetaldehído por una monoaminoOxidasa (MAO). La dopamina y la 4-hidroxifenil acetaldehído son acoplados por una reacción de condensación catalizada por la norcoclorina sintasa (NCS) (Frenzel y Zenk, 1990). En la segunda etapa, la (S)-norcoclorina por medio de dos metilaciones son catalizadas por la enzima 6-O-metiltransferasa (6OMT), y la enzima coclorina N-metiltransferasa (CNMT) mientras que la enzima Nmetilcoclorina 3'hidroxilasa (NMCH) se encarga de la reacción de hidroxilación (Pauli y Kutchan, 1998). Al final, la enzima 3-hidroxy-N-metilcoclorina O-metiltransferasa (4OMT), lleva a cabo la última reacción para obtener la (S)-reticulina (Pauli y Kutchan, 1998; Sato et al., 1994).

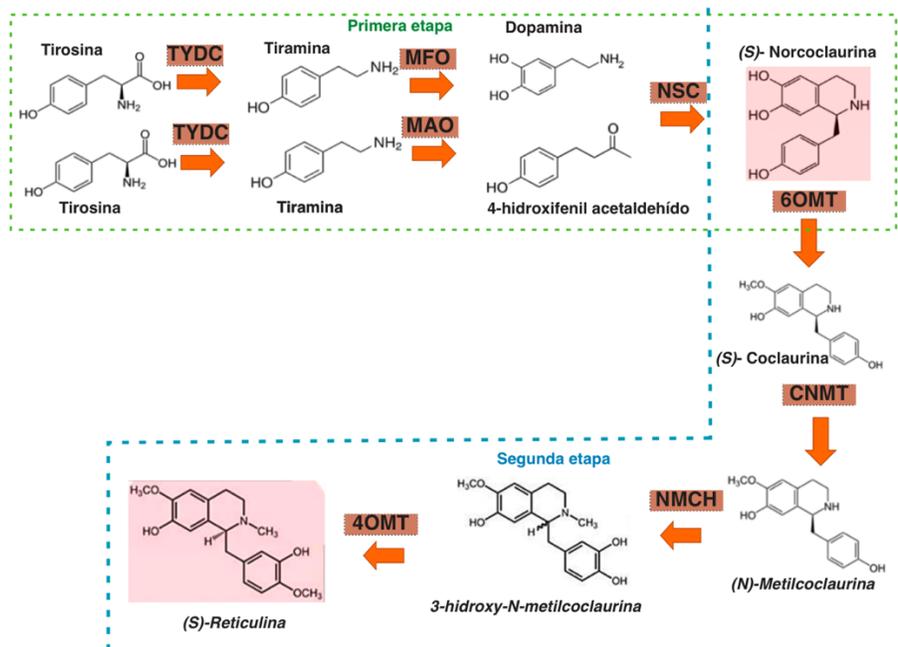


Figura 1. Primera y segunda etapa de la ruta de biosíntesis de de ABl. (Modificado y adaptado a partir de Sato et al., 1994 y Laines-Hidalgo, 2019).

Para la formación de sanguinarina, primero ocurre la conversión de la (S)-reticulina en el componente del puente de metileno de la (S)-Escoulerina por la enzima puente de berberina (BBE). Después la (S)-Escoulerina es convertida a (S)-estilopina por la acción de dos enzimas oxidasas: la (S)-chelantiofolina sintasa (CheSyn) y la (S)-estilopina sintasa (StySyn). La (S)-estilopina es Nmetilada por una enzima llamada tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa (TNMT). Posteriormente la enzima (S)-cis-N-metilestilopina 14-hidroxilasa (MSH) conduce a la formación de protopina. La conversión de protopina a hidrosanguinarina involucra una hidroxilación, realizada por la protopina-6-hidroxilasa (P6H). La dihidrosanguinarina se convierte a sanguinarina por la dihidrosanguinarina oxidasa (DBOX). Una sanguinarina reductasa (SanR) que cataliza la conversión de la sanguinarina en dihidrosanguinarina (Liscombe y Facchini 2008; De-La-Cruz, et al, 2012; Facchini, 2001).

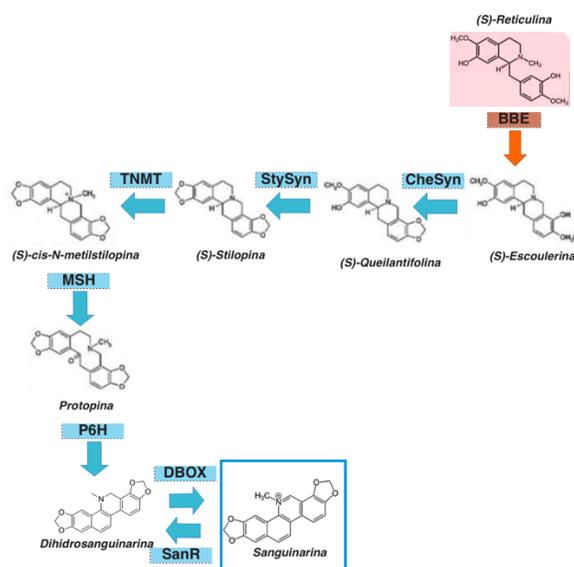


Figura 2. Ruta de la biosíntesis de sanguinarina. (Modificado y adaptado a partir de Liscombe y Facchini 2008; Laines-Hidalgo, 2019).

En relación a la biosíntesis de sanguinarina, se considera que en plantas del género *Argemone* se encuentra presente un mecanismo de detoxificación celular que implica la acción de una enzima denominada sanguinarina reductasa (SanR), el cual consiste en la interconversión de sanguinarina a su precursor, dihidrosanguinarina. Esto ocurre debido a que el producto final (sanguinarina) resulta tóxico para la misma planta en concentraciones elevadas (Vogel et al., 2010).

La síntesis para la producción de berberina como se presenta en la Figura 3, inicia con la conversión de la Sescoulerina en S-tetrahidrocolumbamina, por medio de la escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT). Posteriormente, la S-tetrahidrocolumbamina se convierte en Scanadina por la canadina sintasa (CAS), finalmente, la S-canadina se oxida a berberina por la S-tetrahidroberberina oxidasa (STOX) (De-LaCruz et al., 2012; Facchini, 2001).

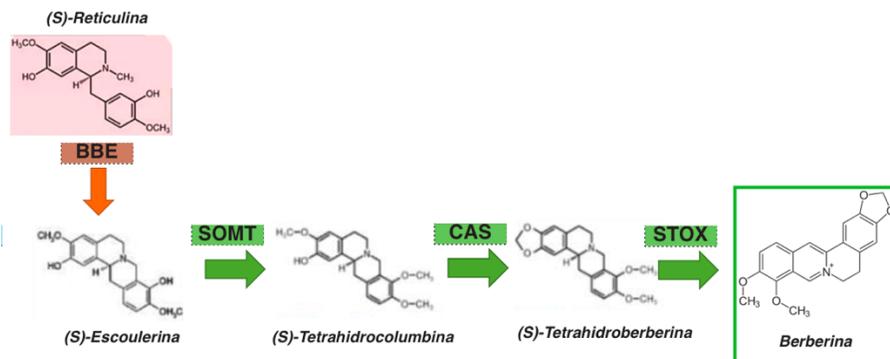


Figura 3. Ruta de la biosíntesis de berberina. (Modificado y adaptado a partir y Laines-Hidalgo, 2019).

En cuanto a estudios moleculares de enzimas involucradas en las primeras dos etapas, se ha identificado el ADN complementario perteneciente a la tirosina descarboxilasa (TYDC) y se ha medido su expresión en *Argemone mexicana*, de manera similar se han analizado otros genes de etapas tanto tempranas como intermedias destacando la reacción de conversión de reticulina a escoulerina catalizada por la enzima del puente de berberina (BBE), paso que resulta crucial por ser el punto de ramificación de las rutas metabólicas de berberina y sanguinarina (Trujillo-Villanueva et al., 2012).

De manera general la última etapa de la biosíntesis de ABIs no se ha estudiado a fondo en *Argemone mexicana*, sin embargo, existe información referente a los genes que codifican las enzimas de las reacciones biosintéticas (Cuadro 2). Los genes analizados corresponden a NCSam1, NCSam2, BBEam1 y BBEam2, como indicadores del tramo común en la ruta de síntesis de ambos alcaloides; además también se añadió a este estudio el análisis del gen SOMT, para la ruta específica de berberina, así como el gen StySyn y CheSyn, para la ruta exclusiva de sanguinarina (Vergara-Olivares; 2016; Gessel et al., 2011).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en análisis de las enzimas involucradas en la biosíntesis de sanguinarina y berberina. Las letras D y R indican primer directo y reverso respectivamente (Rubio- Piña, 2009; Vergara-Olivares; 2016).

Gen	Primer 5'-3'	Longitud (pb)
NCS1	D: CATCGCTAATTACGTTCTCAAGAATCA	241
	R: ATAGTAGTACATGGAATTACCTGGATGGGA	
NCS2	D: CGTACCATTGGAAATCCATGTCAGAA	273
	R: CATCGGACGGTAATTACCCATG	
BBE1	D: CATCTTTGTTTCATCATCTTCTTCTTCTT	268
	R: GATCCTCTTGTGCAACATCTAACGGT	
BBE2	D: CTCATCTTTGTTTCATCTTCTTCTTCTGTC	255
	R: GATCCTCTTGTGCAACATCTAACGGT	
SOMT	D: CAGGATTTGGACCAGAAGCAC	219
	R: ACGATACTCCATCCTCCTCGC	
CheSyn	D: CGTCCACATATTGTTTGAATCCTC	180
	R: ACGATACTCCATCCTCCACGC	
StySyn	D: GTTCAAAATCTAGTACGTCCGCT-3'	200
	R: TCTCTGAACATTTGGTTCTCGT	

Los diversos estudios señalan que la producción de alcaloides en las plantas del género Argemone puede involucrar diferentes tejidos, tipos celulares en el mismo tejido y diferentes compartimentos en una misma célula, esto hace que se presenten diferentes grados de complejidad (Guízar-González et al., 2016). Esto dado que, la berberina se distribuye en toda la planta, pero mayormente en las hojas, por su parte la sanguinarina se acumula casi exclusivamente en la raíz. En las primeras etapas del desarrollo de plántulas justo después de la germinación, solo puede detectarse la presencia de sanguinarina, la berberina comienza a sintetizarse al aparecer las hojas cotiledonarias. En ese sentido la biosíntesis y acumulación de los ABIs requiere del funcionamiento coordinado de los distintos tejidos en la planta o bien la función de la operación de un posible mecanismo de transporte de alcaloides entre los tejidos aéreos y las raíces (Vázquez-Flota et al., 2018).

Conclusión

La biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos berberina y sanguinarina implica una coordinación de varios procesos biológicos tanto celulares como moleculares. De la cual existe suficiente información sobre su biosíntesis, a pesar de ser un mecanismo regulatorio complejo, en el cual están implicados, genes, enzimas, metabolitos secundarios, transportadores específicos, diferentes tejidos, células y compartimentos, sin embargo, a nivel del género argemone no está aún definido si las diferentes etapas de la ruta de síntesis de estos dos alcaloides pueden ocurrir en distintos sitios o tiempos o bien existe un mecanismo de transporte de alcaloides entre los tejidos aéreos y las raíces, es decir dependiendo del metabolito secundario que pretenda aprovecharse, los procesos extractivos pueden enfocarse en un tejido específico de las plantas del género argemone..

Bibliografía

- Brahmachari, G., Gorai, D., & Roy, R. (2013). Argemone mexicana: chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(3), 559-567.
- De-La-Cruz Chacón, I., González-Esquinca, A. R., & Riley-Saldaña, C. A. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas scientiarum*, 17(2).
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847.

- Facchini, P.J., (2001) Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 29-66.
- Frenzel, T., & Zenk, M. H. (1990). S-Adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine-4'-O-methyl transferase, a regio- and stereoselective enzyme of the (S)-reticuline pathway. *Phytochemistry*, 29(11), 3505-3511.
- García, A. Á., & Carril, E.P.U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- Gesell, A., Chávez, M. L. D., Kramell, R., Piotrowski, M., Macheroux, P., & T. M. Kutchan (2011). Heterologous expression of two FAD-dependent oxidases with (S)tetrahydroprotoberberine oxidase activity from *Argemone mexicana* and *Berberis wilsoniae* in insect cells. *Planta*, 233(6), 1185-1197.
- Guizar-González, C., Monforte-González, M., & Vázquez-Flota, F. (2016). Yeast extract induction of sanguinarine biosynthesis is partially dependent on the octadecanoic acid pathway in cell cultures of *Argemone mexicana* L., the Mexican poppy. *Biotechnology letters*, 38(7), 1237-1242.
- Hahn, F. E., & Ciak, J. (1975). Berberine. In *Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents* (pp. 577-584). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hanaoka, M., Yoshida, S., Annen, M., & Mukai, C. (1986). A novel and biomimetic synthesis of (±)-chelamine, (±)-chelidone, sanguinarine, and dihydrosanguinarine from coptisine via a common intermediate. *Chemistry Letters*, 15(5), 739-742.
- Harborne, J. B. (1999). Classes and functions of secondary products from plants. *Chemicals from plants*, 1-25.
- Hernández-Ruiz, J., Bernal, J., Ruiz-Nieto, JE, Gonzales-Castañeda, J., & Mireles-Arriaga, AI (2020). *Argemone ochroleuca*: (Papaveraceae), fuente potencial de alcaloides para usos agrícolas y medicinales. *Agroecosistemas tropicales y subtropicales*, 23 (2).
- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., & Kim, K. M. (2021). Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy*, 11(5), 968.
- Laines-Hidalgo, J.I. (2019). Análisis de la síntesis de alcaloides en fruto y semilla de *Argemone mexicana* L. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. (CICY). 66 P.
- Liscombe, D. K., & Facchini, P. J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 173-180.
- Pauli, H. H., & Kutchan, T. M. (1998). Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant Journal*, 13(6), 793-801.
- Rubio-Piña, J.A. (2009) Estudios moleculares sobre síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 87 p
- Sato, F., Tsujita, T., Katagiri, Y., Yoshida, S., & Y. Yamada (1994). Purification and Characterization of S-adenosyl-L-methionine: norcoclaurine 6-O-Methyltransferase from Cultured *Coptis japonica* Cells. *European Journal of Biochemistry*, 225(1), 125131.
- Sato, F., Tsujita, T., Katagiri, Y., Yoshida, S., & Yamada, Y. (1994). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: norcoclaurine 6-O-methyltransferase from cultured *Coptis japonica* cells. *European journal of biochemistry*, 225(1), 125-131.
- Trujillo-Villanueva, K., Rubio-Piña, J., Monforte-González, M., Ramírez-Benitez, E., & F. Vázquez-Flota (2012). The sequential exposure to jasmonate, salicylic acid and yeast extract promotes sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnology Letters*, 34(2), 379-385
- Vázquez-Flota, F., Rubio-Piña, J., Xool-Tamayo, J., Vergara-Olivares, M., Tamayo-Ordoñez, Y., Monforte-González, M., & Mirón-López, G. (2018). Tissue distribution of transcripts involved in biosynthesis of benzyloisoquinoline alkaloid in mature plants of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Revista fitotecnia mexicana*, 41(1), 13-21.
- Vergara-Olivares, M. V. (2016). Análisis de la redundancia genética en la ruta de síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* L. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 87 p.
- Vogel, M., Lawson, M., Sippl, W., Conrad, U., & W. Roos (2010). Structure and mechanism of sanguinarine reductase, an enzyme of alkaloid detoxification. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18397-18406.
- Ziegler, J., & Facchini, P. J. (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59(2), 735-769.