

## Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos

Iván De-La-Cruz Chacón<sup>1,2</sup>, Alma Rosa González-Esquinca<sup>1</sup>, Christian Anabí Riley-Saldaña<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Chiapas, México.

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México; Distrito Federal, México.

\*ivan.cruz@unicach.mx; aesquinca@unicach.mx; christian.riley@unicach.mx

Recibido: 14-07-2012; Aceptado: 05-08-2012

### Resumen

Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI) son metabolitos especializados con una distribución filogenética antigua pero conservada todavía en clados modernos. Varios de ellos, como la morfina, sanguinerina y berberina tienen importancia en la medicina moderna. En esta revisión se analizan los aspectos más sobresalientes del estado actual de la biosíntesis de ABI. Se han realizado estudios que han permitido conocer la biosíntesis de 22 de estos metabolitos nitrogenados. En su formación participan 43 enzimas agrupadas en oxidoreductasas, transferasas y liasas, que en algunos casos representan ejemplos atípicos de la forma en la que se originó la diversificación del metabolismo secundario, entre ellos proteínas citocromo P450 (CYP450) con actividades catalíticas para la ruta de los ABI, o la enzima norcoclaurina sintasa (NCS) que esta emparentada con proteínas alergénicas de defensa. Así mismo, hay avances genéticos en los que se ha podido caracterizar 30 enzimas, permitiendo conocer procesos de regulación. Otro aspecto interesante es la compartimentación de los sitios de biosíntesis y acumulación de ABI ya que en varios casos están separados espacialmente y en distintas especies o en la misma pueden participar varios tipos de células. Ello ha sugerido el transporte intra e intercelular de los alcaloides, los precursores y de las enzimas, se ha documentado el transporte de berberina entre el citoplasma y las vacuolas del almacenamiento. El panorama de la biosíntesis de ABI se ha construido con los estudios de ejemplares de importancia farmacológica.

**Palabras clave:** metabolismo especializado, metabolismo secundario, transporte celular, compartimentación celular, regulación tejido-específica.

### Abstract

**Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis.** The benzylisoquinoline alkaloids (BIA) are specialized metabolites with an ancient phylogenetic distribution, but still preserved in modern clades. Some of them, such as morphine, sanguinerine or berberine, are important for modern medicine. This review discusses the highlights of the current state of the biosynthesis of BIA. There have been studies that show the biosynthesis of 22 of these nitrogenous metabolites. In their formation there are 43 enzymes grouped into oxidoreductases, transferases and lyases, which in some cases represent atypical examples of the manner in which the secondary metabolism diversification was originated. Two of these examples are the cytochrome proteins P450 (P450), with catalytic activities for ABI route, or the norcoclaurine synthase enzyme (NCS), which share substantial identity with defense allergenic proteins. Likewise, there are genetic advances that have produced the characterization of 30 enzymes, allowing knowledge of regulatory processes. Another interesting aspect is the compartmentation of the biosynthesis sites and accumulation of BIA, since in several cases they are spatially separated and in different species, or in the same species several types of cells may be involved. This has suggested intra and intercellular transport of alkaloids, precursors and enzymes, and it has been documented berberine transport between the cytoplasm and the vacuoles of storage. The picture for the biosynthesis of BIA has been constructed with exemplary studies of alkaloids with pharmacological importance.

**Key words:** specialized metabolism, secondary metabolism, cellular transport, cell compartment, tissue-specific regulation.

## Resumo

**Biosíntese de alcalóides benzilisoquinolinas.** Os alcalóides benzilisoquinolinas (ABI) são metabólitos especializados com uma distribuição filogenética antiga, mas ainda preservada em clados modernos. Vários deles, como a morfina, sanguinarina e berberina são importantes na medicina moderna. Neste artigo, se analisam os aspectos mais destacados do estado atual da biosíntese de ABI; há estudos que tem permitido conhecer a biosíntese de 22 desses metabólitos nitrogenados. Na sua síntese participam 43 enzimas agrupadas em oxidoreductases, transferases, liases e, em alguns casos, representam exemplos atípicos da forma pela qual se originou a diversificação do metabolismo secundário, incluindo as proteínas do citocromo P450 (CYP450), com atividades catalíticas para a rota dos ABI, ou a enzima norcoclaurina sintase (NCS), que está relacionada com proteínas alergênicas de defesa. Da mesma forma, há avanços genéticos na caracterização de 30 enzimas, permitindo conhecer processos de regulação. Outro aspecto interessante é a compartimentalização dos sítios de biosíntese e acumulação de ABI uma vez que em muitos casos estão separados espacialmente e em diferentes espécies, ou na mesma podem participar vários tipos de células. Isto há sugerido o transporte intra e intercelular de alcalóides, precursores das enzimas; tem sido documentado o transporte de berberina entre o citoplasma e os vacúolos de armazenamento. A perspectiva na biosíntese de ABI foi construída com os estudos de exemplares de importância farmacológica.

**Palavras-chave:** metabolismo especializado, metabolismo secundário, transporte celular, compartimentalização celular, regulação tecido-específica.

## Introducción

Las plantas producen metabolitos secundarios, recientemente renombrados como metabolitos especializados, moléculas que no son ubicuas, y que no están directamente involucradas con los procesos primarios de crecimiento y desarrollo, lo que significa que no son necesarias en el metabolismo primario, pero que cumplen con alguna función ecológica y que toman precursores para su biosíntesis del metabolismo primario (1-4).

Dentro de estos metabolitos especializados se encuentran los alcaloides, cerca de 21, 000 compuestos encontrados hasta hoy en el 20% de la plantas, son moléculas nitrogenadas de bajo peso molecular con una amplia variedad de estructuras químicas y de actividades biológicas (5-8). Algunos de ellos como la vincristina y el taxol son usados como fármacos anticancerígenos y otros más incluyendo a la morfina como potentes analgésicos. Hasta ahora, la razón de ser de los alcaloides en las plantas está justificada por sus implicaciones ecológicas, ya que son barreras químicas contra fitopatógenos (bacterias, hongos y virus) y herbívoros o reservorios de nitrógeno (6, 9).

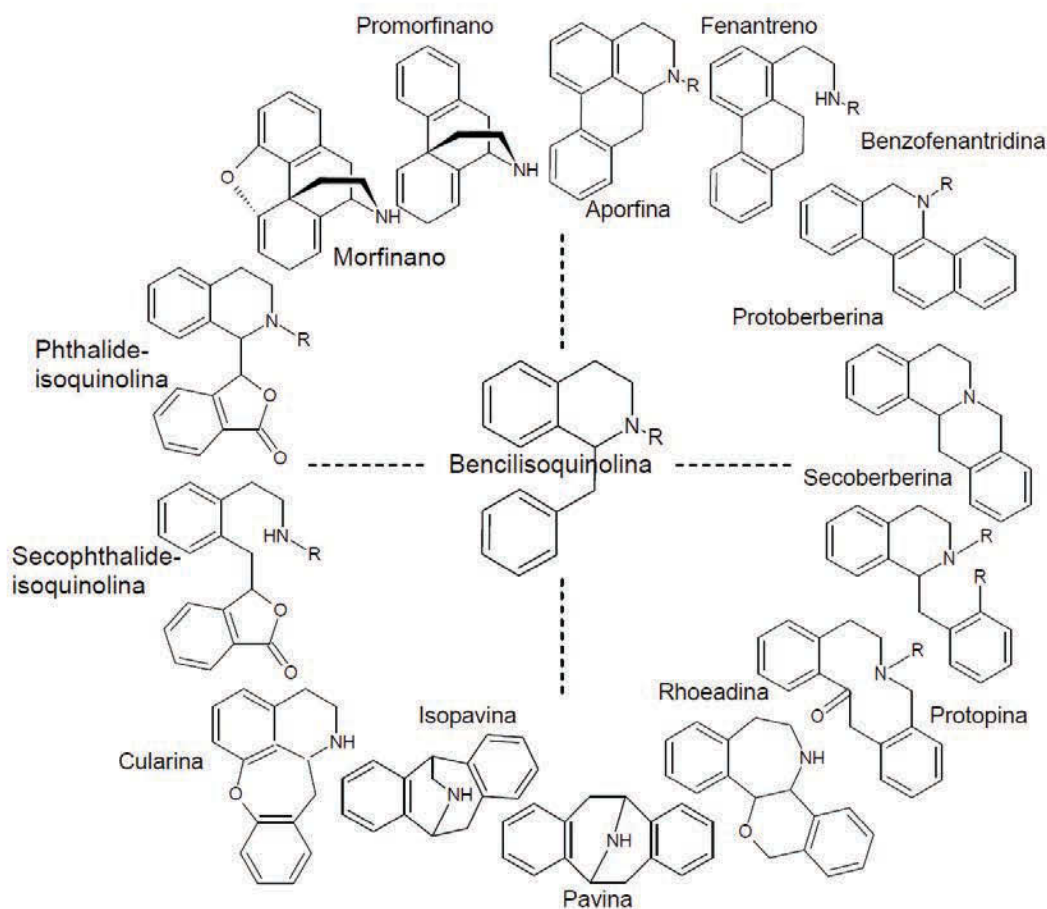
La importancia de estos compuestos naturales tanto para las plantas como para los humanos ha llamado la atención de varios investigadores. Se han podido determinar aspectos celulares y moleculares de su biosíntesis, entre ellos las formas, los sitios, los momentos y la regulación (10-12). Uno de los puntos más interesantes es el relacionado con la compartimentación de las rutas de biosíntesis, en donde están involucrados diferentes tejidos, células, orgánulos y transportadores específicos. El entendimiento de estos aspectos permite un acercamiento a la forma en la cual las células y los tejidos de las plantas resuelven un movimiento

coordinado de precursores, intermediario, productos, enzimas y transcritos para la formación de metabolitos secundarios. En el estudio de este tema está integrado el uso de herramientas modernas y tradicionales en las áreas de biología celular y molecular, genética, química y bioquímica y en varios casos son investigaciones de frontera. En este trabajo se documenta el conocimiento actual sobre la biosíntesis de alcaloides benzilisoquinolínicos y su coordinación espacio temporal.

## Biosíntesis de alcaloides benzilisoquinolínicos

El primer alcaloide benzilisoquinolínico (ABI) conocido fue la morfina, aislada del opio por Friedrich Wilhelm Sertürner en 1804, constituyendo todo un suceso en la química de los productos naturales (13, 14). Hoy se cuenta con un número cercano a 2500 estructuras, que se caracterizan por presentar un esqueleto carbonado básico que proviene de un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro bencil (sistema 1-benciltetrahydroisoquinolina, 1-btiq) (15). La diversidad estructural resulta de las modificaciones al esqueleto 1-btiq por hidroxilaciones, reducciones, oxidaciones, formación de enlaces C-C y *O*- y *N*-metilaciones (16, 17), de tal forma que se pueden distinguir básicamente 13 subtipos: simples, aporfinas, benzofenantridinas, bisbenzilisoquinolinas, cularinas, ftalideisoquinolinas, morfinaños, morfinaandienonas, pavinas/isopavinas, protoberberinas, protopinas, rhoeadinas/paverrubinas, y secoberberinas (**Figura 1**) (16, 18, 19).

Los ABI además de ser reconocidos por las propiedades farmacológicas que exhiben (**Tabla 1**), tienen importancia biológica porque son moléculas con un origen vegetal



**Figura 1.** Diversidad estructural de alcaloides bencilisoquinólicos (16,19).

**Tabla 1.** Alcaloides bencilisoquinólicos de interés farmacológico (81).

Alcaloide	Actividad farmacológica	Planta de donde se aisló
Anonaína	Antimicrobiano	<i>Annona muricata</i>
Berberina	Antimicrobiano	<i>Coptis japonica</i>
Codeína	Analgésico narcótico, Antitusígeno	<i>Argemone mexicana</i>
Colchicina	Disruptivo muscular	<i>Colchium autumnale</i>
Emetina	Parasiticida	<i>Uragoga ipecacuanha</i>
Liriodenina	Antimicrobiana, Anticancerígeno	<i>Annona diversifolia</i>
Morfina	Analgésico narcótico	<i>Papaver somniferum</i>
Noscapina	Antiespasmódico, Potencial antineoplásico	<i>Papaver somniferum</i>
Papaverina	Vasodilatador	<i>Papaver somniferum</i>
Sanguinarina	Antimicrobiano	<i>Sanguinaria canadensis</i>
(+)-Tubocurarina	Bloqueador muscular	<i>Chondodendron tomentosum</i>
Tetrandrina	Bloqueador de canales de Ca <sup>2+</sup>	<i>Stephania tetandra</i>



que aún no han sido aisladas y/o caracterizadas de plantas productoras de ABI aunque se ha reconocido su actividad catalítica (21, 23-25). En tanto que, sobre la diversificación de la ruta, los avances más importantes se han centrado sobre seis ramas que inician con (S)- reticulina y permiten la biosíntesis de alcaloides a) bencilisoquinolínicos simples (papaverina) (26-29), b) tipo protoberberina (berberina) (22, 30-32), c) tipo benzofenantidrina (sanguinerina) (33-36), d) morfínicos (morfina) (17,37), e) aporfina (magnoflorina) (30) y f) tipo ftalideisoquinolina (noscapina) (32). Así también se conocen las enzimas que producen los ABI diméricos como la berbamunina que se originan de un precursor que

precede a la (S)-reticulina (38-39). Dependiendo de la ruta de diversificación se necesitan entre diez y veinte enzimas para obtener un alcaloide como producto final (**Tabla 2**).

Un esquema actualizado de la diversidad biosintética se representa en la figura 2. Este plano bioquímico se ha construido con estudios de biosíntesis en plantas y/o cultivos celulares de *Argemone mexicana*, *Berberis stolonifera*, *B. beaniana*, *B. canadiensis*, *Coptis japonica*, *Corydalis vaginans*, *Eschscholzia californica*, *Papaver somniferum*, *P. bracteatum*, *Thalictrum flavum*, *T. tuberosum*, *T. bulgaricum*, *Tinospora caffra*, *T. cordifolia* y *Sanguinaria canadense*.

**Tabla 2. Enzimas involucradas en la biosíntesis de Alcaloides Bencilisoquinolínicos.**

Clave: Nombre común	Nomenclatura IUBMB	Participación en la ruta de ABI	Referencia
<b>TYDC:</b> tirosina dopa descarboxilasa	<b>EC. 4.1.1.25.</b> L-amino-acid:oxygen oxidoreductase	PC	(21, 23)
<b>*EC. 4.1.1.80.</b> 4-hidroxifenilpiruvato descarboxilasa	<b>EC. 4.1.1.80.</b> 4-hydroxyphenylpyruvate carboxy-lyase	PC	(21,82)
<b>*EC 1.4.3.2.</b> L-amino-acido oxidasa	<b>EC 1.4.3.2.</b> L-amino-acid:oxygen oxidoreductase	PC	(21,82)
<b>*EC 1.4.18.1.</b> monofenol oxigenasa	<b>EC 1.4.18.1.</b> monophenol monooxygenase	PC	(21,82)
<b>*EC 1.14.16.2.</b> tirosina 3-monooxigenasa	<b>EC 1.14.16.2.</b> L-tyrosine,tetrahydrobiopterin:oxygen oxidoreductase	PC	(21,82)
<b>TyrAT:</b> tirosina transferasa	<b>EC 2.6.1.?.</b> AminoTransferasa	PC	(25)
<b>NCS:</b> (S)-norcoclaurina sintasa	<b>EC 4.2.1.78.</b> 4-hydroxy-phenylacetaldehyde hydro-lyase	PC	Samanani & Facchini en 82
<b>6OMT:</b> (RS)-norcoclaurina 6-O-metiltransferasa	<b>EC 2.1.1.128.</b> S-adenosyl-L-methionine:(RS)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase	ID	Sato <i>et al.</i> , en 82
<b>CNMT:</b> (S)-coclaurina-N-metiltransferasa	<b>EC 2.1.1.140.</b> S-adenosyl-L-methionine:(S)-coclaurine-N-methyltransferase	ID	Loeffler <i>et al.</i> , en 82
<b>NMCH:</b> N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa	<b>EC 1.14.13.71.</b> (S)-N-methylcoclaurine, NADPH:oxygen oxidoreductase	ID	Pauli <i>et al.</i> , en 82
<b>4OMT:</b> 3'-hidroxi-N-metil-(S)-coclaurina 4'-O-metiltransferasa	<b>EC 2.1.1.116.</b> S-adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-N-methyl-(S)-coclaurine 4'-O-methyltransferase	ID	Frenzel <i>et al.</i> , en 82
<b>N7OMT:</b> norreticulina 7-O-metiltransferasa	EC 2.1.1.?? Transferasa (metil)	ABIS	Pienkny <i>et al.</i> , en 82
<b>7OMT:</b> reticulina 7-O-metiltransferasa	EC 2.1.1.?? Transferasa (metil)	ABIS	Ounaroon <i>et al.</i> , en 82
<b>CTS (CYP80G2):</b> corituberina sintasa	EC 1.14.-? Oxidoreductasa	APO	Ikezawa en 82
<b>CNMT:</b> magnoflorina sintasa	EC 1.14.-?. S-adenosyl-L-methionine:coclaurine N-methyltransferase	APO	Ikezawa en 82
<b>BBS:</b> berbamunina sintasa	<b>EC 1.14.21.3</b> antes EC 1.1.3.34 (S)-N-methylcoclaurine,NADPH:oxygen oxidoreductase	BisBenz	Stadler & Zenk en 82

<b>BBE:</b> enzima del puente de berberina	EC 1.21.3.3 anteriormente EC 1.5.3.9. (S)-reticuline:oxygen oxidoreductase	BZF y PB	Kutchan <i>et al.</i> , en 82
<b>CheSyn:</b> (S)-cheilanthifolina sintasa	EC 1.14.21.2. (S)-scoulerine, NADPH:oxygen oxidoreductase	BZF	Bauer and Zenk en 82
<b>StySyn:</b> (S)-estilopina sintasa	EC 1.14.21.1. (S)-cheilanthifoline,NADPH:oxygen oxidoreductase	BZF	Bauer and Zenk en 82
<b>TNMT:</b> (S)-tetrahidroprotoberberina N-metiltransferasa	EC 2.1.1.122. S-adenosyl-L-methionine:(S)-7,8,13,14-tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase	BZF	Rueffer et al en 82
<b>P6H:</b> protopina 6 hidroxilasa	EC 1.14.13.55. protopine, NADPH:oxygen oxidoreductase	BZF	Tanashi <i>et al.</i> , Takemura <i>et al.</i> , en 82
<b>DBOX:</b> dihidrobenzofenantridina oxidasa	EC 1.5.3.12. dihydrobenzophenanthridine:oxyg en oxidoreductase	BZF	Arakawa <i>et al.</i> , en 82
<b>DSMO:</b> dihidrosanguinarina 10-monooxigenasa	EC 1.14.13.56. dihydrosanguinarine,NADPH:oxy gen oxidoreductase	BZF	De-Eknamkul <i>et al.</i> , en 82
<b>HDSMO:</b> 10-hidroxi-dihidrosanguinarina 10-O-metiltransferasa	EC 2.1.1.119. S-adenosyl-L-methionine:10-hydroxydihydrosanguinarine 10-O-methyltransferase	BZF	De-Eknamkul <i>et al.</i> , en 82
<b>DCHMO:</b> dehidrochelirubina 12-monooxigenasa	EC 1.14.13.57. dihydrochelirubine,NADPH:oxygen oxidoreductase	BZF	Kammerer <i>et al.</i> , en 82
<b>12CHMT:</b> 12-hidroxi-dihidrochelirubina 12-O-metiltransferasa	EC 2.1.1.120. S-adenosyl-L-methionine:12-hydroxydihydrochelirubine 12-O-methyltransferase	BZF	Kammerer <i>et al.</i> , en 82
SMOT1	EC 2.1.?.?. Transferasa (metil)	FTI	(32)
<b>DRS:</b> 1,2-dehidroreticulina sintasa	EC 1.5.?.?.	MFO	Hirata <i>et al.</i> , en 82
<b>DRR:</b> 1,2- dehidroreticulina reductasa	EC 1.5.1.27. (R)-reticuline:NADP+ oxidoreductase	MFO	De-Eknamkul & Zenk en 82
<b>SaISyn:</b> salutaridina sintasa	EC 1.14.21.4. (R)-reticuline,NADPH:oxygen oxidoreductase	MFO	Gerardy & Zenk en 82
<b>SaIR:</b> salutaridina reductasa	EC 1.1.1.248. salutaridinol:NADP+ 7-oxidoreductase	MFO	Gerardy & Zenk en 82
<b>SaAT:</b> salutaridinol 7-O-acetiltransferasa	EC 2.3.1.150. acetyl-CoA:salutaridinol 7-O-acetyltransferase	MFO	Lenz & Zenk, en 82
<b>T6ODM:</b> thebaina 6-O-demetilasa	EC 1.14.11.31. thebaine,2-oxoglutarate:oxygen oxidoreductase	MFO	Hagel <i>et al.</i> , en 82
<b>COR:</b> codeinona reductasa	EC 1.1.1.247. codeine:NADP+ oxidoreductase	MFO	Lenz <i>et al.</i> , en 82
<b>CODM:</b> codeina O-demetilasa	EC 1.14.11.32. codeine,2-oxoglutarate:oxygen oxidoreductase	MFO	Hagel <i>et al.</i> , en 82
<b>SOMT:</b> (S)-escoulerina 9-O-metiltransferasa	EC 2.1.1.117. S-adenosyl-L-methionine:(S)-scoulerine 9-O-methyltransferase	PB	Muemmler <i>et al.</i> ,; Takeskita en 82
<b>STOX:</b> (S) tetrahidroberberina oxidasa	EC 1.3.3.8 anteriormente 1.5.3.8. (S)-tetrahydroberberine:oxygen oxidoreductase	PB	Amann <i>et al.</i> , en 82
<b>TCoOMT:</b> tetrahidrocolumbamina 2-O-metiltransferasa	EC. 2.1.1.89. S-adenosyl-L-methionine:5,8,13,13a-tetrahydrocolumbamine 2-O-methyltransferase	PB	Beecher <i>et al.</i> , en 82
<b>CAS:</b> (S)-canadina sintasa	EC. 1.14.21.5. (S)-tetrahydrocolumbamine,NAD PH:oxygen oxidoreductase	PB	Rueffer & Zenk en 82
<b>TNMT:</b> tetrahidroprotoberberina-N-metiltransferasa	EC 2.1.1.122. S-adenosyl-L-methionine:(S)-7,8,13,14-tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase	PB	Rueffer <i>et al.</i> , em 82



<b>MTMO:</b> metiltetrahidroprotoberberina 14-monooxigenasa	<b>EC 1.14.13.37.</b> (S)-N-methylcanadine,NADPH:oxygen oxidoreductase	PB	Rueffer & Zenk en 82
<b>CoOMT:</b> columbamina O-metiltransferasa	<b>EC. 2.1.1.118.</b> S-adenosyl-L-methionine:columbamine O-methyltransferase	PB	Rueffer <i>et al.</i> , em 82
<b>COS:</b> coridalina sintasa	<b>EC 2.1.1.147.</b> S-adenosyl-L-methionine:protoberberine 13-C-methyltransferase	PB	Rueffer <i>et al.</i> , en 82
<b>COX:</b> columbamina oxidasa	<b>EC 1.21.3.2</b> antes EC 1.1.3.26. columbamine:oxygen oxidoreductase	PB	Rueffer & Zenk, em 82
<b>RCAS:</b> (R)-canadina sintasa	<b>EC 1.5.1.31.</b> (R)-tetrahydroberberine:NADP+ oxidoreductase	PB	Bauer & Zenk, en 82

\*Enzimas cuya actividad se ha determinado, pero que no han sido aisladas aun de plantas productoras de ABI. Biosíntesis de: BZF= Benzonfenantridinas, APO = Aporfinas; ABIS = Bencilisoquinolínicos simples; BisBenz = bencilisoquinolínicos diméricos; ID = Intermediario de diversificación; FTI = fhtalideosoquinolinas; MF = Morfinanos; PB= Protoberberinas; PC= precursor central; 4HFA = 4 hidroxifenilacetaldehído. 4 HFP = 4-hidroxifenilpiruvato

En suma, se ha podido dilucidar la participación de 43 enzimas en la biosíntesis de los ABI, agrupadas en 25 oxidoreductasas, 15 transferasas y 3 liasas. Dentro de las oxidoreductasas, sobresalen las dependientes de citocromo P450 (CYP), tanto por el número (diez) como por sus características enzimáticas, por ejemplo, las CYP80 y CYP719 encontradas en la ruta de los ABI, son enzimas típicas de las plantas productoras de alcaloides (40,41). En tanto que, las de la familia CYP719A han sido encontradas solo en plantas productoras de ABI, catalizando la formación de los puentes metilendioxi (28), lo que talvez signifique que la evolución de estas CYP permitió la presencia y diversificación de los ABI. Otro grupo representativo de enzimas de la ruta son las S-adenosil-L-metionina metiltransferasas (trece). La metilación enzimática es una reacción ubicua que ocurre en diversos organismos y resulta en la modificación de las moléculas para diferentes propósitos funcionales o regulatorios, en la biosíntesis de ABI participan tres N-metiltransferasas y diez O-metiltransferasas (OMT). Las OMT catalizan la transferencia de un grupo metilo desde S-adenosil-L-metionina a un átomo de oxígeno de un hidroxilo y participan en la formación no solo de ABI sino de varios metabolitos especializados, permitiendo la diversificación de estructuras y en muchos casos la alteración de la solubilidad de la molécula y el incremento de sus actividades ecológicas (42). Las dos liasas tienen una participación clave en la ruta, la TYDC que desvía la tirosina a la biosíntesis de ABI y la NCS que produce el precursor central, ambas son estimuladas por la presencia de patógenos (43, 44). En el caso de la NCS hay estudios que la emparenta genéticamente con proteínas que aparecen en la planta en condiciones patológicas, agrupadas bajo el nombre genérico de Pathogenesis-Related, proteínas PR o de patogenicidad. La enzima NCS es la única proteína conocida de la familia PR10 tipo Betv1 (proteínas alergénicas) que

demuestra de manera inequívoca actividad catalítica en las plantas (44). Como se puede constatar la biosíntesis de ABI tiene enzimas especiales que hacen muy atractivo su estudio bioquímico, genético, fisiológico y evolutivo.

Ha sido posible caracterizar los ADN complementarios de cerca de 30 enzimas, 24 solo en *P. somniferum*, lo que ha permitido conocer aspectos moleculares sobre la regulación de esta ruta (11, 45-49). Los avances más importantes se centran sobre la biosíntesis de algunos compuestos sobresalientes por su importancia medicinal, la mayor parte de las rutas de diversificación permanecen desconocidas.

### Compartimentación de los sitios de biosíntesis y acumulación de ABI

Se ha avanzado en la comprensión de la biosíntesis del metabolismo especializado, incluso de la expresión y regulación de los genes implicados, sin embargo son escasos los estudios sobre los mecanismos que gobiernan la distribución espacial de las enzimas, cofactores y sustratos que intervienen en la biosíntesis de alcaloides (50). Este aspecto es importante para todo el metabolismo en general, ya que por si solas, la distribución y localización específica en diferentes sitios celulares o tisulares de las enzimas han sido consideradas como otro mecanismos de regulación, la compartimentación permite la optimización de reacciones enzimáticas al procurar diversos entornos de pH subcelulares, permitiendo el funcionamiento simultáneo de las vías que compiten por los mismos sustratos, evita además, los ciclos fútiles y confina los metabolitos tóxicos. Sin embargo y con frecuencia esta separación requiere del transporte de los diferentes metabolitos de un punto a otro para su conversión

(51-53), por tanto, existen proteínas específicas de transporte que facilitan y regular la importación y exportación de metabolitos a través de membranas, contribuyendo al control del flujo entre compartimentos (54).

En la biosíntesis y almacenamiento de ABI participan diferentes tipos de tejidos, células y orgánulos, por ejemplo en *P. somniferum*, la biosíntesis de morfina y noscapina ocurre en los tallos y raíces y se acumulan en el citoplasma de células especializadas (células laticíferas) de los carpelos y de las cápsulas de los frutos, mientras que la sanguinarina es biosintetizada y acumulada en las raíces; en *B. stolonifera*, la berberina al parecer es biosintetizada y almacenada en todos los órganos (23, 35, 55).

Generalmente las enzimas se encuentran reunidas en un solo tejido aunque pueden tener una distribución más amplia, algunas como NCS, SaSyn y SaIR involucradas en la biosíntesis de morfina, son más abundantes en raíces y brotes que en el resto de la planta (56-58). Otras como NMCH son más abundantes en los tallos y disminuyen gradualmente en las raíces, hojas y tejidos florales (58). Inclusive los transcriptos de la SOMT, enzima que participa en la biosíntesis de noscapina, se acumulan mayormente en los tejidos aéreos de *P. somniferum* en donde ocurre la acumulación de los alcaloides (32).

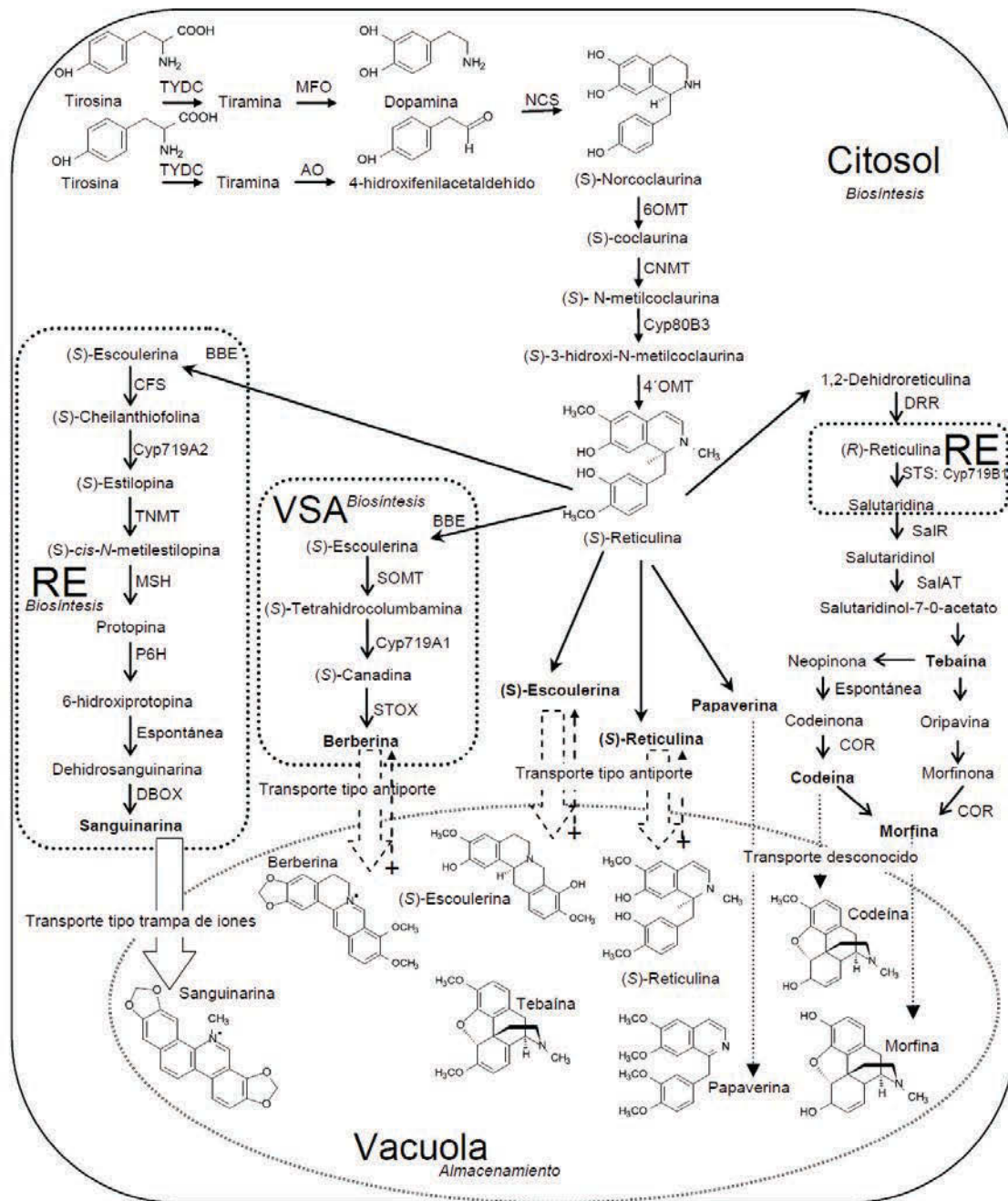
Esta diferenciación espacial puede ser mayor ya que la expresión genética y la actividad de las enzimas correspondientes, se ubica exclusivamente en ciertas células o compartimentos subcelulares. Por ejemplo Bird *et al.* (2003), Weid *et al.* (2004) y Samanani *et al.* (2006) demostraron en *Papaver somniferum* que en la biosíntesis y acumulación de morfina, sanguinarina y alcaloides relacionados, participan distintos tipos de células del floema tanto de los tallos como de las raíces (59-61). Utilizando técnicas de inmunofluorescencia e hibridación de ARN *in situ* Bird *et al.* (2003) y Samanani *et al.* (2006) encontraron que 7 de las 14 enzimas de la ruta para alcaloides tipo morfina [6OMT, CNMT, NMCH, 4'OMT, BBE, SaIAT y COR] están localizadas en los elementos cribosos, mientras que los transcriptos de éstas se encuentran en las células acompañantes y los alcaloides en células laticíferas (59,61). En tanto que Weid *et al.* (2004) y Kutchan (2005) señalan que en los tallos las enzimas 4'OMT y SaIAT están ubicadas en el parénquima y COR en las células laticíferas, mientras que en la raíz las enzimas 4'OMT, 7'OMT y SaIAT fueron encontradas en el periciclo del estele y BBE en las células del parénquima del cortex (10, 60). La diferencia de resultados pareciera estar en el grado de desarrollo de los tejidos vasculares que se analizaron en esos estudios, mientras que Weid

*et al.* (2004) al parecer tomaron muestras en donde los elementos cribosos aun eran inmaduros, Samanani *et al.* (2002 y 2006) analizaron ejemplares con grados de madurez completos (60, 62). Los autores por su lado también atribuyen diferencias en los métodos y técnicas de estudio, así como en las variedades de las plantas analizadas por ejemplo la variedad de pobreza en morfina vs silvestre, así como en las condiciones de cultivo (controladas vs campo). En todo caso surge la pregunta ¿La biosíntesis de alcaloides en *P. somniferum* ocurre durante su desarrollo en diferentes sitios? Esta interesante discusión entre el grupo de P. Facchini y T. M. Kutchan, tiene en común la mención de que la localización de los componentes del metabolismo de ABI está altamente compartimentada. A su vez, la participación de los elementos cribosos en la biosíntesis de ABI rompe el paradigma de que estas células solamente poseían un número limitado de proteínas requeridas para la conservación celular y el transporte de solutos (12). En esta década, a los elementos cribosos también se le han atribuido otras funciones fisiológicas que incluyen el transporte de macromoléculas de información y la biosíntesis de ácido jasmónico, ácido ascórbico y compuestos de defensa (63). Además Bock *et al.* (2002) señalan que BBE está también en los idioblastos de las hojas (64)

*Thalictrum flavum* también produce y acumula abundantes cantidades de ABI tipo protoberberina en distintas células de las raíces y rizomas. En raíces, los ABI se localizan en las células maduras de la endodermis en el inicio del crecimiento secundario, mientras que los transcriptos génicos de nueve de las doce enzimas (TYDC, NCS, 6OMT, CNMT, NMCH, 4'OMT, BBE, SOMT, CAS) implicadas en su biosíntesis están ubicados en la endodermis inmadura, periciclo y en algunos casos en las células adyacentes corticales del meristemo apical. En tanto que, en los rizomas los alcaloides se depositan en la médula y el cortex y los transcriptos génicos de las nueve enzimas en el protodermis del primordio foliar (31, 62). Esto significa que los sitios de biosíntesis y acumulación están separados espacialmente y que en distintas especies o en la misma pueden participar distintos tipos de células.

La biosíntesis de ABI está compartimentada subcelularmente, las dos primeras partes de la ruta de tirosina a (S)-norcoclaurina y de (S)-norcoclaurina a (S)-reticulina, se realizan en el citosol, mientras que las rutas de diversificación en vesículas membranosas cuya independencia o asociación al retículo endoplásmico está en plena discusión (**Figura 3**) (11, 12, 37, 65). Esta compartimentación de enzimas, sustratos y productos implica la coordinación y regulación de la ruta lo que no ocurriría si las enzimas y los sustratos se movieran libremente en el citosol (12, 66).





**Figura 3.** Tráfico celular de alcaloides. TYDC = Tirosina Dopa descarboxilasa; MFO = Monofenol oxidasa; AO = Aminooxidasa; NCS = Norcoclaurina sintasa; 6OMT = (*S*)-norcoclaurina-6-*O*-metiltransferasa; CNMT = (*S*)-coclaurina-*N*-metiltransferasa; Cyp80B3 = (*S*)-*N*-metilcoclaurina-3'-hidroxilasa; 4'OMT = (*S*)-3'-hidroxi-*N*-metilcoclaurina-4'-*O*-metiltransferasa; BBE = berberina sintasa; SOMT = (*S*)-scoulerina-9-*O*-metiltransferasa; Cyp719A1 = (*S*)-canadina sintasa; STOX = (*S*)-tetrahidroxyprotoberberina oxidasa; CFS = cheilanthifolina sintasa; Cyp719A2 = Stilopina sintasa; TNMT = Tetrahidroprotoberberina sintasa; MSH = *N*-metilstilopina 14-hidroxilasa; P6H = protopina 6-hidroxilasa; DBOX = dihidrobenzofenantridina oxidase; DRS = 1,2-dehidroreticulina sintasa; DRR; 1,2-dehidroreticulina reductasa; STS = Salutaridina sintasa; SaIR = Salutaridina reductasa; SaIAT = Salutaridinol 7-*O*-acetiltransferasa; COR = codeinona reductasa. RE = Retículo endoplásmico; VSA = Vesícula biosintetizadora de alcaloides. ¿? = Enzimas sin ubicación.

Para la producción de alcaloides tipo benzofenantridina (sanguinarina) desde (*S*)-reticulina se necesitan siete enzimas, cuatro de ellas (BBE, CFS, SPS y MSH), se localizaron (utilizando gradientes de centrifugación con sacarosa) en fracciones de membranas con una densidad específica de  $\delta = 1,14$  g/mL y solo una (P6H) estuvo asociada a una fracción de membrana con una densidad de  $\delta = 1,11$  g/mL, consistente con la del retículo endoplasmático (RE) (12, 37, 65). La enzima STS que participa en la biosíntesis de alcaloides tipo morfina, y las enzimas (*S*)-tetrahidroprotoberberina oxidasa (STOX), canadina oxidasa (CDO: CYP719A1) y (*S*)-adenosil-l-metionina: columbamina-*O*-metiltransferasa participantes en la biosíntesis de alcaloides tipo protoberberina se localizan también en fracciones microsomales con una densidad 1,14 g/mL (37, 67). La asociación de estas enzimas con fracciones de membrana de densidad más grande que las del retículo endoplasmático es lo que permitió especular la presencia de “vesículas biosintetizadoras de alcaloides (VSA)” (68). Estas vesículas se han encontrado en algunas especies productoras de ABI (Annonaceae, Berberidaceae, Menispermaceae y Ranunculaceae), en *Berberis* y *Coptis* se observaron como agregados dentro de vacuolas pequeñas conteniendo alcaloides y enzimas (11, 67). Es interesante el hecho de que la adición de precursores a las vesículas dio como resultado intermediarios avanzados de la ruta, y si además se suplementa con una sola enzima (SOMT, que no estaba asociada a estos compartimentos), se encuentra una producción de ABI congruente con la ruta (67).

Sin embargo, otros autores dudan de la autonomía de estas vesículas, argumentando que con excepción de la BBE, las enzimas mencionadas, son dependientes del citocromo P450, por lo que se ha sugerido que son proteínas ubicadas (integrales o parciales) en las membranas del retículo endoplasmático (RE) o en compartimentos derivados de este, asociadas a enzimas NAD(P)H dependiente de citocromo P450 como donadora de electrones (12, 37, 65). Además el pH óptimo de BBE es de 8,8, acorde al de las membranas del RE (65, 68). Sin dejar de notar que la ubicación de los transcriptos en otras células volvería complejo la independencia de compartimentos de biosíntesis.

Alcantara *et al.* (2005) utilizando centrifugación en gradiente de densidad y técnicas de inmunolocalización, situó las enzimas NMCH y BBE en el retículo endoplasmático y COR en el citosol de células de *P. somniferum* (68). En este mismo estudio se documentó que al contaminar los cultivos celulares de *P. somniferum* con el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, aumentaron tanto las enzimas como el alcaloide sanguinarina, y que están asociados con el desprendimiento de vesículas prolongadas desde el lumen del RE y a su vez conectadas con la vacuola central. En estas extensiones

también estuvieron presentes las enzimas NMCH y BBE, lo que permite conjeturar que la biosíntesis de ABI está asociada al retículo endoplasmático.

Un hecho contundente es que los ABI se almacenan en vacuolas; los alcaloides berberina, codeína, morfina, noscapina, papaverina, (*S*)-reticulina, sanguinarina, (*S*)-escoulerina y tebaína, fueron encontrados en vacuolas de diferentes densidades en cultivos celulares de *P. bracteatum* y *Coptis japonica* (37, 55, 70-72). En las vacuolas laticíferas de *Chelidonium majus* las concentraciones de sanguinarina, chelidonina y berberina se aproximaron a 500 y 1000 mM, mientras que en las del latex de *P. somniferum* a 500 mM de morfina y en vacuolas de células de *Coptis japonica* hasta 72 mM de berberina (55, 71).

La participación de varios tipos de células y de orgánulos en la biosíntesis y acumulación de ABI supone el transporte de sustratos, intermediarios y productos desde los sitios productores (vesículas de RE de elementos cribosos y/o parénquima en *P. somniferum*) a los sitios de depósito (vacuolas de células laticíferas). El transporte de metabolitos secundarios ha empezado a ser sistemáticamente estudiado (73), algunas revisiones pueden leerse en Yazaki, 2005; Roytrakul y Veepoorte, 2007; Yazaki *et al.* 2008 (72, 74, 75).

Para los alcaloides bencilisoquinolínicos se han propuesto y documentado dos mecanismos de transporte hacia las vacuolas y uno en el tránsito por la membrana plasmática. Matile (1984) y Otani *et al.* (2005) señalan que algunos ABI pueden almacenarse en la vacuola mediante un modelo simple causado por un gradiente de pH conocido como “trampa de iones”, proponen que en el caso de alcaloides de carácter lipofílico y en una situación de pH neutro como la del citosol, pueden cruzar el tonoplasto (membrana que delimita la vacuola celular) por difusión simple, y una vez dentro debido al ambiente ácido que hay en ella y a la presencia de sales inorgánicas se protonizan a cationes hidrofílicos lo que impide su regreso a través de la membrana quedando atrapados en este compartimento (71, 75, 76). Un ejemplo de esto parece ocurrir con sanguinarina (una molécula lipofílica) y con otros alcaloides no bencilisoquinolínicos (ajmalicina, cinchonamina, colchicina, ergotamina, nicotina, vinblastina y vindolina, Revisado en Wink y Roberts, 1998) (55). Otani *et al.* (2005) señalan, por otra parte que el tráfico está asociado a un mecanismo de transporte secundario utilizando el gradiente electroquímico de protones ( $H^+$ ), estos investigadores sugieren que la berberina se mueve de esta forma a través del tonoplasto mediante una proteína cotransportadora tipo antiporte, aprovechando la expulsión de un protón para introducir el alcaloide a la vacuola con una  $K_m$  de 43,7 mM (71).

Para el paso por las membranas plasmáticas se ha implicado la participación de proteínas transportadoras ABC de la membrana impulsadas por ATP (*ATP binding cassette*). El único ejemplo es el paso de la berberina a través del plasmalema de células de *Coptis japonica* y de *Thalictrum flavum* (77-79). Para *C. japonica* la proteína fue genéticamente caracterizada como CjMDR1, dada su similitud con la familia de las proteínas transportadoras ABC fármaco resistentes (MDR por sus siglas en inglés) (78).

Estos estudios señalan que el transporte de berberina en las células ocurre mediante dos mecanismos de transporte, uno impulsado por proteínas transportadoras ABC (intracelular) y el otro por cotransportadores proton-antiportador (intercelular). Este último tipo de mecanismo parece estar también implicado en el tráfico de (S)-reticulina y (S)-escoulerina en las vacuolas de *Fumaria capreolata* (71, 72, 80).

## Conclusión

La biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos, implica una coordinación de varios procesos biológicos tanto celulares como moleculares. La separación de estos eventos en tiempo y espacio, deja ver un mecanismo regulatorio complejo, en el cual están implicados, genes, enzimas, metabolitos secundarios, transportadores específicos, diferentes tejidos, células y compartimentos. La visión que se tiene de ello todavía es parcial y fragmentaria, lo que a su vez la convierte en un reto intelectual en el área del metabolismo especializado.

## Financiación

Este trabajo fue soportado en parte por una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT).

## Conflicto de intereses

Los autores no tienen conflicto de intereses con relación a este trabajo

## Referencias

- Hagel JM, Facchini PJ. Plant metabolomics: analytical platforms and integration with functional genomics. *Phytochemistry Review* 2008; **7**:479-497.
- Jenke-Kodama H, Müller R, Dittmann E. Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity. *Progress in Drug Research* 2008; **65**:119, 119-140
- Mithöfer A, Boland W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology* 2012; **63**:431-50.
- Pichersky E, Lewinsohn E. Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annual Review of Plant Biology* 2011; **62**:549-66.
- Aniszewski T. Alkaloids -Secrets of life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Elsevier. Amsterdam: 2007
- Wink M. Ecological rol alkaloids. *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*, Edited by E. Fattorusso and O. Tagliatalata-Scafati. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2008; 3-9.
- Kroymann J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 2011; **14**(3):246-51.
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology .The Gold Book. Version 2.3.1. 2012..<http://goldbook.iupac.org/>. Consultado 22 de Mayo de 2012
- Hartmann T, Ober D. Defense by pyrrolizidine alkaloids: developed by plants and recruited by insects. In: Schaller A, ed. *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Berlin: Springer Science+Business Media B.V. 2008; pp 213-231.
- Kutchan TM. A role for intra and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 2005; **8**: 292-300.
- Zenk MH, Juenger M. Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*. 2007; **68**: 2757-2772.
- Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid Biosynthesis: metabolism and trafficking". *Annual Review, Plant Biology* 2008; **59**: 735-769.
- Schäfer D. Milk of paradise? Opium and opiates in nineteenth and twentieth century literature. *Der Schmerz* 2007; **21**(4):339-44, 346.
- Meyer A, Imming P. Benzylisoquinoline Alkaloids from the Papaveraceae: The Heritage of Johannes Gadamer (1867-1928). *Journal Natural Products* 2011;**74**, 2482-2487.
- Waterman PG. Alkaloid Chemosystematics. Chapter 14. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* Vol. 50. Editado por Geoffrey A. Cordell. Academic Press 1998; 533-567
- Zenk MH, Rueffer M, Amann M, Deus-Neumann, Nagakura N. Benzylisoquinoline biosynthesis by cultivated plant cells and isolated enzymes. *Journal of Natural Products* 1985; **48** (5): 725-738.

17. Ziegler J, Facchini PJ, Geibler R, Schimdt J, Ammera C, Kramell R, Voigtländer S, Gesell A, Pienkny S, Brandt W. Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* 2009; **70**: (15-16): 1696–1707.
18. Shulgin AT, Perry WE. The Simple Plant Isoquinolines. Transform Press, Berkeley CA 2002.
19. Liscombe DK, MacLeod BP, Loukanina N, Nandi OI, Facchini PJ. Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* 2005; **66**:(11): 1374-1393.
20. Wink M. Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites”, en *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Michael Wink (ed), *Annual plant reviews* 2010; **40**: 1-19.
21. Rueffer M, Zenk MH. Enzymatic formation of protopines by a microsomal cytochrome P-450 system of *Corydalis vaginans*. *Tetrahedron Letters* 1987; **28**: 5307-5310.
22. Hashimoto T, Yamada Y. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology* 1994; **45**: 257-85.
23. Facchini PJ, De Luca V. Phloem-specific expression of Tyrosine/Dopa Decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. *Plant Cell* 1995; **7** (11): 1811-1821.
24. Samanani N, Liscombe DK, Facchini PJ. Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Plant Journal* 2004; **40**(2):302-13.
25. Lee EJ, Facchini PJ. Tyrosine Aminotransferase contributes to benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Plant Physiology* 2011; **157** (3): 1067-1078.
26. Ounaroon A, Decker G, Schmidt J, Lottspeich F, Kutchan TM. (R,S)-Reticuline 7-O-methyltransferase and (R,S)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase of *Papaver somniferum*-cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *The Plant Journal* 2003; **36** (6): 808-819.
27. Pienkny S, Brandt W, Schmidt J, Kramell R, Ziegler J. Functional characterization of a novel benzyloquinoline O-methyltransferase suggests its involvement in papaverine biosynthesis in opium poppy (*Papaver somniferum* L). *The Plant Journal* 2009; **60** (1): 56-67.
28. Ikezawa N, Iwasa K, Sato F. Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 that catalyzes an intramolecular C–C Phenol coupling of (S)-reticuline in magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2008; **283** (14): 8810-8821
29. Han X, Lamshöft M, Grobe N, Ren X, Fist AJ, Kutchan TM, Spiteller M, & Zenk MH. The biosynthesis of papaverine proceeds via (S)-reticuline. *Phytochemistry*. 2010; **71** (11-12): 1305-1312.
30. Ikezawa N, Tanaka M, Nagayoshi M, Shinkyo R, Sakaki T, Inouye K, Sato F.. Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; **278** (40): 38557-38565.
31. Samanani N, Park SU, Facchini PJ. Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *Plant Cell* 2005; **17**: 915-926.
32. Dang TTT, Facchini PJ. Characterization of three O-methyltransferases involved in noscapine biosynthesis in opium poppy. *Plant Physiology* 2012; **159** (2): 618-631.
33. Kutchan TM, Zenk MH. Enzymology and molecular biology of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *Journal Plant Research* 1993; **3**: 165-73.
34. Zenk MH. The formation of benzophenanthridine alkaloids. *Pure and Applied Chemistry* 1994; **66** (10-11): 2023-2028.
35. Díaz Chávez ML, Rolf M, Gesell A, Kutchan TM. Characterization of two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P450-dependent enzymes of alkaloid formation in the Mexican prickly poppy *Argemone mexicana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2011; **507** (1):186-193.
36. Takemura T, Ikezawa N, Iwasa K, Sato F. Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 in sanguinarine biosynthesis from *Eschscholzia californica* cells. *Phytochemistry* 2012; **En prensa**.
37. Facchini PJ, Bird DA. Developmental regulation of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy plants and tissue cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 1998; **34** (11): 69-79.
38. Stadler R, Zenk MH. The purification and characterization of a unique cytochrome P-450 enzyme from *Berberis stolonifera* plant cell cultures. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; **268**: 823-831.
39. Kraus PFX, Kutchan TM. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminine synthase, a C-O phenol-coupling cytochrome P450 from the higher plant *Berberis stolonifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995; **92**: 2071-207.
40. Mizutani M, Ohta D. Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annual Review of Plant Biology*

- 2010; **61**: 291-315.
41. Mizutani M, Sato F. 2011. Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2011; **507**(1): 194-203.
  42. Lam KC, Ibrahim RK, Behdad B, Dayanandan S. Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome* 2007; **50** (11): 1001-13.
  43. Facchini PJ, Johnson AG, Poupart J, de Luca V. Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiology* 1996; **111** (3): 687-97.
  44. Lee EJ, Facchini P. Norcoclaurine Synthase Is a Member of the Pathogenesis-Related 10/Bet v1 Protein Family. *The Plant Cell* 2010; **22**: 3489-3503.
  45. Facchini PJ, MJillian M, Hagel JL, Liscombe DK, Loukanina N, B.J. MacLeod BJ, Samanani N, Zulak KG. Opium poppy: blueprint for an alkaloid factory. *Phytochemistry Reviews* 2007; **6**: 97-124.
  46. Facchini PJ, De Luca V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal* 2008; **54**: 763-784.
  47. Liscombe DK, Facchini PJ. Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis *Current Opinion in Biotechnology* 2008; **19**: 173-180.
  48. Wijekoon CP, Facchini PJ. Systematic knockdown of morphine pathway enzymes in opium poppy using virus-induced gene silencing. *The Plant Journal* 2012; **69** (6): 1052-1063.
  49. Desgagné-Penix I, Farrow SC, Cram D, Nowak J, Facchini PJ. Integration of deep transcript and targeted metabolite profiles for eight cultivars of opium poppy. *Plant Molecular Biology* 2012; **79** (3): 295-313.
  50. RozeL V, Anindya C, John EL. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetic Biology* 2011; **48**(1): 35-48.
  51. Loyola-Vargas VM, Sánchez-Iturbe P, Canto-Canché B, Gutiérrez-Pacheco LC, Gálaz-Avalos RM, Moreno-Valenzuela O. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad de Química de México* 2004; **48**: 67-94.
  52. Lunn JE. Compartmentation in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* 2007; **58** (1): 35-47.
  53. Mintz-Orona S, Meira S, Malitskya S, Ruppinb E, Aharonia A, Shlomid T. Reconstruction of Arabidopsis metabolic network models accounting for subcellular compartmentalization and tissue-specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; **109** (1): 339-344.
  54. Linka N, Weber PMA. Intracellular metabolite transporters in plants. *Molecular Plant* 2010; **3** (1): 21-53.
  55. Wink M, Roberts MF. Compartmentation of alkaloids synthesis, transport and storage. Chapter 10. In Roberts MF & Wink M (eds) *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*, Plenum Press, New York. 1998. pp. 239-262.
  56. Gerady, R. and Zenk, M.H. Formation of salutaridine from (R)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 1993; **32** (11):79-86.
  57. Unterlinner B, Lenz R, Kutchan TM. Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*. *Plant Journal* 1999; **18**: 465-475.
  58. Huang FC, Kutchan TM. Distribution of morphinan and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 2000; **53**: 555-64
  59. Bird AD, Franceschi VR, Facchini PJ. A tales of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *The Plant Cell* 2003; **5**: 2626-2635.
  60. Weid M, Ziegler J, Kutchan TM. The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; **101**: 13957-13962.
  61. Samanani N, Alcantara J, Bourgault R, Zulak KG, Facchini PJ. The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. *Plant Journal* 2006; **47**: 547-563.
  62. Samanani N, Yeung EC, Facchini PJ. Cell type specific protoberberine alkaloid accumulation in *Thalictrum flavum*. *Journal Plant Physiology* 2002; **139**: 1189-1196.
  63. Hancock RD, McRae D, Haupt S, Viola R. Synthesis of l-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biology*. 2003; **3**: 7.
  64. Bock A, Wanner G, Zenk MH. Immunocytological localization of two enzymes involved in berberine biosynthesis. *Planta*. 2002; **216** (1): 57-63.
  65. Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic

- engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology* 2001; **52**: 29–66.
66. Facchini PJ. Regulation of alkaloid in plants. *The alkaloids*. **63**:1-35 en Cordell Geoffrey I. The Alkaloids. Academic Press-Elsevier, USA, The Alkaloids. Academic Press-Elsevier. 2006.
67. Facchini PJ, Johnson AG, Bird DA. Regulation of alkaloids biosynthesis in opium poppy and related species: Prospects for pathway engineering. *AgBiotech News and Information* 1997; **9** (6): 131N-138N.
68. Alcantara J, Bird DA, Franceschi VR, Facchini PJ. Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant Physiology* 2005; **138**: 173-183.
69. Steffens P, Nagakura N, Zenk MH. Purification and characterization of the berberine bridge enzyme from *Berberis beaniana* cell cultures. *Phytochemistry* 1985; **24**: 2577-2583.
70. Kutchan TM, Rush M, Coscia CJ. Subcellular localization of alkaloids and dopamine in different vacuolar compartments of *Papaver bracteatum*. *Plant Physiology* 1986; **81** (1): 161-166.
71. Otani M, Nobukazu S, Kyoko S, Enrico M, Fumihiko S, Kazufumi Y. Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology* 2005; **138**: 1939-1946.
72. Yazaki K, Sugiyama A, Morita M, Shitan N. Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochemistry Review* 2008; **7**: 513-524.
73. Badri DV, Loyola-Vargas VM, Broeckling CD, De-la-Peña C, Jasinski M, Santelia D, Martinoia E, Lloyd W, Sumner LW, Banta LM, Stermitz F, Vivanco JM. Altered Profile of Secondary Metabolites in the Root Exudates of Arabidopsis ATP-Binding Cassette Transporter Mutants. *Plant Physiology* 2008; **146**: 762-771.
74. Yazaki K. Transporters of secondary metabolites. *Current Opinion Plant Biology* 2005; **8** (3): 301-307.
75. Roytrakul S, Verpoorte R. Role of vacuolar transporter proteins in plant secondary metabolism: *Catharanthus roseus* cell culture. *Phytochemistry Reviews*. 2007; **6** (2-3): 383-396.
76. Matile P. Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle *Naturwissenschaften*; 1984; **71**: 18-24.
77. Sakai K, Shitan N, Sato F, Ueda K, Yazaki K. Characterization of berberine transport into *Coptis japonica* cells and the involvement of ABC protein. *Journal of Experimental Botanical*. 2002; **53** (376): 1879-1886.
78. Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K. Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; **100** (2): 751-756.
79. Terasaka K., Sakai K, Sato F, Yamamoto H, Yazaki K. *Thalictrum minus* cell cultures and ABC-like transporter. *Phytochemistry* 2003; **62** (3): 483-489.
80. Deus-Neumann B, Zenk MH. Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve an ion-trap mechanism *Planta* 1986; **167** (1): 44-53.
81. Singla D, Sharma A, Kaur J, Panwar B, Raghava. BIAdb: Acurated database of Benzylisoquinoline alkaloids. *BMC Pharmacol* 2010; **10**: 4.
82. Genome: Isoquinoline alkaloid biosynthesis, pathway ec00950. [http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ec00950+1.14.21.5](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ec00950+1.14.21.5). Revisado 02 Junio de 2012.