



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN BOTÁNICA**

## **PRODUCCIÓN DE TAXOIDES EN CULTIVOS *in vitro* DE CALLOS Y CÉLULAS ELICITADAS DE *Taxus globosa***

**HEBERT JAIR BARRALES CUREÑO**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

2013

La presente tesis titulada: **PRODUCCIÓN DE TAXOIDES EN CULTIVOS *in vitro* DE CALLOS Y CÉLULAS ELICITADAS DE *Taxus globosa*** realizada por el alumno: **M.C. HEBERT JAIR BARRALES CUREÑO** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ

ASESOR



DRA. ANA CARMELA RAMOS VALDIVIA

ASESOR



DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

ASESOR



DRA. LIBIA IRIS TREJO TÉLLEZ

ASESOR



DRA. MARTHA ELVA RAMÍREZ GUZMÁN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2013

**PRODUCCIÓN DE TAXOIDES EN CULTIVOS *in vitro* DE CALLOS Y CÉLULAS  
ELICITADAS DE *Taxus globosa*  
Hebert Jair Barrales Cureño, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2013  
RESUMEN**

Los objetivos de este trabajo fueron: establecer un método de propagación *in vitro* para callos y células en suspensión de *Taxus globosa*, se realizaron pruebas de viabilidad celular; se elicitaron suspensiones celulares con jasmonato de metilo, etanol y una combinación de peróxido de hidrógeno con butionina de sulfoximina. Se cuantificaron tres taxoides: taxol, cefalomanina y 10-diacetil baccatina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en cultivos *in vitro* de callos, células elicitadas y hojas de *T. globosa*. La inducción de los callos se originó a los 40 días, el mayor porcentaje se obtuvo con el tratamiento de picloram y polivinil pirrolidona. El análisis por Cromatografía Líquida de hojas de un extracto crudo en metanol registró la mayor acumulación de taxoides totales, mientras que en el extracto crudo de callos con metanol se observó una alta concentración de 10-diacetil baccatina. Los cultivos crecidos en medios de cultivo B5 con 13.4  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenacético y 6.72  $\mu\text{M}$  de picloram, presentaron el mejor crecimiento y una coloración verde cristalina. La prueba de diacetato de fluoresceína reveló que muchas de las células fluorescen, indicando que los cultivos celulares se mantienen viables a lo largo del tiempo. Se observó el efecto de las hormonas a nivel microscópico sobre las células, en el medio de cultivo adicionado con ácido naftalenacético las células se mostraron alargadas y formando agregados, con ácido naftalenacético y bencil-aminopurina las células mostraron proliferación; con ácido naftalenacético y picloram, las células mostraron una elongación y separación celular. La máxima ganancia en peso seco se observó con los tratamientos de BSO y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el octavo día después de la siembra. Con jasmonato de metilo se presentó el menor crecimiento en el octavo día. El pH de los cultivos celulares osciló en un rango de 5.2 a 6.2. Respecto al volumen de medio consumido, éste fue ascendente. En los experimentos de elicitación los resultados fueron: la mayor acumulación de taxoides se obtuvo en el tratamiento con peróxido de hidrógeno más butionina de sulfoximina, aumentando 81 % la producción de 10-diacetil baccatina en el sexto día, 2 % la cefalomanina en el octavo día y con una detección menor a 1% de taxol en el décimo día respecto al control.

**Palabras clave:** 10-diacetil baccatina, cefalomanina, taxol, anticáncer, fitohormonas, viabilidad celular.

**TAXOIDS PRODUCTION IN CROP OF CALLOS *in vitro* AND ELICITED CELLS  
OF *Taxus globosa***

**Hebert Jair Barrales Cureño, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2013**

**ABSTRACT**

The objectives of this study were: to establish a method of propagation *in vitro* in callus and cells, to perform HPTLC assays in callus, cell viability testing, to elicit cell suspensions with methyl jasmonate, ethanol and a combination of hydrogen peroxide with buthionine sulfoximine. Three taxoids were quantified: taxol, cephalomannine and 10-diacetyl baccatin using High Resolution Liquid Chromatography in callus *in vitro* cultures, elicited cells and leaves of *T. globosa*. The callus induction of *T. globosa* was originated after 40 days, the highest percentage was obtained with treatment of picloram and polyvinyl pyrrolidone. Liquid Chromatography analysis showed the greatest accumulation of taxoids in sheets from crude extract with methanol. HPLC analysis of the crude extract of callus with methanol had a high concentration of 10-diacetyl baccatin. FDA testing revealed that many of the cells fluoresced, indicating that the cell cultures remain viable throughout the time. It was observed that the effect of hormones on a microscopic level on cells in culture medium supplemented with naphthalene acetic acid the cells were long and forming groups. On treatment naphthalene acetic acid/benzyl-aminopurine showed cell proliferation; on treatment with the phytohormones naphthalene acetic acid/picloram showed cell elongation and cell separation. The maximum dry weight gain was observed with treatments of hydrogen peroxide plus buthionine sulfoximine on the eighth day after sowing. With methyl jasmonate elicitor, a slower growth was shown on the eighth day. pH units of the crops ranged from 5.2 to 6.2. In relation to the volume of spent medium, this consumption was ascending. In the experiments of elicitation the results were: accumulation of taxoids as obtained in the treatment with hydrogen peroxide plus buthionine sulfoximine, increasing 81% of the production of 10-diacetyl baccatin on the sixth day, 2% cephalomannine in the eighth day and with the lower detection of taxol in the tenth day related to control.

**Keywords:** 10-diacetyl baccatin, cephalomannine, taxol, anticancer, phytohormones, cell viability.

## DEDICATORIAS

Creo que es el momento de dejar por escrito los grandes sentimientos y profundos agradecimientos que siento por todos ustedes. Han sido parte de mi pensamiento diario.

*A Dios*, te tendría que escribir un gran libro para expresar todo el agradecimiento que siento por ti, cada momento de mi vida personal, académica, cultural pero sobre todo la espiritual. He llegado a esta etapa de mi vida, gracias por enseñarme a ser paciente y sabio, por cuidarme y bendecirme. Te amo. Eres el mejor científico del Mundo.

*A mi papá Ezequiel Barrales Cruz*: gracias por ayudarme a superarme en esta vida. Por ti aprendí que el poder de la oración de Fe actúa siempre a nuestro favor. Eres el mejor papá.

*A mi mamá Guadalupe Cureño Córdova*, otro triunfo logrado para ti, es el fruto de un gran esfuerzo, gracias por la confianza depositada en mí y por sentirme seguro en tu amor. Eres la mejor y perfecta madrecita santa de todo el mundo.

*A mis abuelitos Pedro Barrales Zaragoza y Luis Cureño Gómez a mis abuelitas Teresa Cruz Cruz (†) y América Córdova Ibarra. A todos mis tíos y tías, a todos mis primos y primas*. Les expreso todo mi cariño.

*A mi hermana Dulce Guadalupe Barrales Cureño y mi cuñado Mauro David Mendoza Sandoval*: gracias por quererme tanto como yo a ustedes, son un gran ejemplo de valentía y amor, los amo y deseo que sigan brillando como un diamante. Gracias por todas sus oraciones.

*A mi hermano Edson Israel Barrales Cureño*: te felicito por ser papá de 2 niñas preciosas, por seguir el camino del Señor Jesucristo y a tu esposa *Mercedes Vázquez* porque son un ejemplo de matrimonio perfecto.

*A mis sobrinitas Linda Teresita Barrales y Azul Barrales*: que hermosas niñas, espero de todo corazón que alguna de ustedes se dedique a la ciencia.

*A mi gran tía Dra. Silvia Villegas Ortiz*, que maravillosos momentos hemos vivido juntos, su valiosa amistad sincera ha sido para mí un gran motivador de que la experiencia es un tesoro. A Simba e hijos.

*A mi gran tío Dr. Marco Favio Ramírez*, gracias por ser un ángel en mi camino, porque entre usted, tía Silvia y yo formamos un trinomio perfecto.

*A mis hermanos en la Fe Cristiana*: por su gran confianza depositada en mí, en especial al hermano *Daniel Pérez Medina* y su familia, gracias por darme la oportunidad de predicar.

*A Charles H. Spurgeon*, le agradezco a Dios haberme puesto en el camino de la Fe, y así mismo, encontrar los hermosos temas que predicaba este pastor en Londres, Inglaterra y que llevados a este siglo reflejan el mismo significado en esta actualidad.

*A la enfermera Paz Bata*, amiga mía gracias por tus sabios consejos. Este triunfo es para usted y toda su familia.

*A mi maravillosa amiga Q.F.B. Raqueline de la Rosa Montoya*: contigo aprendí tu fortaleza interior, por la gran amistad que nos une. Recuerda que te estimo mucho a ti, a tu esposo Alejandro y a tus hijos Alejandra y a Pablito, tantas conversaciones de superación personal llegaron a ser lo que hoy soy.

*A mi gran amiga Dra. Petra Andrade*, por enseñarme a arriesgarme a todo, yo que todo lo pienso y analizo, has sido un aliciente en mi vida personal y en mis estudios doctorales, nuestras conversaciones filosófico-científicas nos ayudaron a concluir una meta más.

*A Thalía Sodi Miranda*, te envío muchos saludos desde aquí hasta Manhattan, New York!, eres parte de la inspiración de mí como científico. Nunca olvidare cuando te conocí aquel 11 de abril de 2010. Saludos a Sabrina Säkae y a Mathew Alejandro.

*A mis compañeros del lab. 27 del Cinvestav: Dra. Ariana, Dra. Ileana, Dr. David*, que momentos tan científicos viví con ustedes, han sido para mí un gran ejemplo científico e intelectual.

*Al M.C. Gonzalo Lucho*, fue un privilegio conocerte a ti y a tu esposa *Fabiola*, eres el amigo que todos quisiéramos tener, le agradezco a Dios el haberme puesto en mí y tu camino, te admiro! Nuestros buenos pensamientos nos ayudaron a construir realidades en nuestras vidas doctorales.

*A la M.C. María Elena Monroy, a la M.C. Sandra, a la secretaria Dalila del posgrado en Genética, al maestro Juan Carlos y a todos los que omito por falta de espacio.*

Finalmente es necesario mencionar que con mi doctorado aprendí a ser paciente y que una buena actitud determinó la calidad de vida que tengo. Gracias a todos por ayudarme a pensar en grande con pensamientos tan elevados para cristalizar grandes realidades.

*Lo más importante es tener gratitud...*

## AGRADECIMIENTOS

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca No. 26496, otorgada durante el periodo agosto 2008-agosto 2012, para la realización de mi Doctorado en Ciencias.

**Al Colegio de Postgraduados** por el Fideicomiso Institucional Núm. 167304 otorgado para el desarrollo del proyecto de investigación y al **Programa de Botánica** por permitirme adquirir los conocimientos científicos necesarios para enfrentar la vida científica.

*Al Dr. Marcos Soto Hernández*, gracias por invitarme a participar en esta gran Tesis Doctoral, sin usted no hubiese llegado hasta este día, donde se cristaliza otro sueño más alcanzado. Le doy gracias a la vida y sobre todo a Dios por haberlo conocido en este siglo. Usted ha sido un gran orientador, guía, consejero pero sobre todo un gran amigo en el que confiare eternamente. Gracias nuevamente por proyectarme hacia el futuro, que ahora lo veo más esperanzador y seguro.

*A la Dra. Ana C. Ramos Valdivia*, por su paciencia infinita que tuvo para conmigo, siendo un gran ejemplo de inteligencia, enseñanza, tenacidad y fortaleza. Nada de esto hubiese sido posible sin la ayuda de usted en todo momento.

*A la Dra. Libia Iris Trejo Téllez*, tanto usted como su esposo el *Dr. Fernando Gómez Merino* han sido un aliciente y un gran ejemplo de vida científica para mí. Gracias por brindarme su valiosa amistad.

*A la Dra. Martha Elva Ramírez Guzmán*, gracias por su apoyo en el análisis estadístico de mi tesis doctoral.

*Al Dr. Mariano Martínez Vázquez*, gracias por su sabios consejos. Le agradezco su apoyo en mi tesis doctoral.

*A la Dra. Cecilia Peña Valdivia*, gracias por ser un ejemplo de científica. Le agradezco su apoyo en la revisión de mi tesis doctoral.

*Al Dr. Rodolfo García Nava*, usted ha sido un gran amigo que me ha orientado por el sendero de la ciencia y a enseñarme a que nunca me deje vencer por ningún obstáculo.

*A todos los Doctores del Posgrado en Botánica*, muchas gracias por los conocimientos que adquirí y la enseñanza de los conocimientos prácticos.

*Al M.C. Rubén San Miguel Chávez*, que bueno fue contar con su ayuda en todo momento, gracias por sus consejos y la ayuda experimental.

*A la M.C. Gabriela Rebeca Luna Palencia y la técnica laboratorista Carmen Lafontaine*: les agradezco toda su enseñanza, calidad humana y moral, por su labor diaria en el laboratorio.

*“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero dulces los frutos”*

# ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	4
1.2 OBJETIVOS.....	5
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	5
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
1.5 HIPÓTESIS.....	6
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL TEJO.....	6
2.2 TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN.....	7
2.4 USO MEDICINAL.....	8
2.6 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> (SCHLECHT.).....	10
2.8 GENERALIDADES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	14
2.9 REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL.....	15
2.9.1 CULTIVO DE CALLOS.....	16
2.9.2 CRECIMIENTO DE CALLOS Y SUSPENSIONES CELULARES.....	18
2.9.3 HETEROGENEIDAD Y VARIACIÓN SOMACLONAL.....	19
2.9.4 APLICACIONES DE LOS CULTIVOS EN SUSPENSIÓN.....	20
2.9.5 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CALLOS DE <i>TAXUS</i> SPP.....	22
2.9.6 PRODUCCIÓN DE TAXOIDES EN CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DE CALLOS DE <i>TAXUS</i> SPP.....	23
2.9.7 FASES DEL CULTIVO DE CÉLULAS VEGETALES EN SUSPENSIÓN.....	24
2.9.8 PRODUCCIÓN DE TAXOIDES EN CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DE <i>TAXUS</i> SPP.....	24
2.10 GENERALIDADES DEL CÁNCER.....	26
2.10.1 TRATAMIENTO PARA EL CÁNCER.....	27
2.10.2 TAXOL Y TAXOTERE.....	27
2.10.3 FARMACOCINÉTICA DEL TAXOL.....	28
2.10.4 DOSIS DEL TAXOL.....	29
2.10.5 ESTADÍSTICAS DEL CÁNCER EN MÉXICO.....	29
2.11 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL TAXOL.....	33
2.11.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL TAXOL.....	35
2.11.2 FUENTES DE TAXOL.....	37
2.11.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL TAXOL.....	37
2.11.4 BIOSÍNTESIS DE LOS TAXOIDES.....	40
2.11.5 SÍNTESIS DEL TAXOL.....	48
2.11.6 SEMISÍNTESIS ORGÁNICA DE LOS TAXOIDES.....	49
2.12 ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	50
2.12.1 ELICITACIÓN.....	52
2.12.2 JASMONATOS.....	54
2.12.3 QUÍMICA Y ORIGEN.....	55
2.12.4 DIFERENCIAS ENTRE EL ÁCIDO JASMÓNICO Y METIL JASMONATO.....	56
2.12.8 EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO COMO AGENTE ELICITOR.....	60
2.12.9 BUTIONINA DE SULFOXIMINA.....	62
2.12.10 FUNCIONES Y METABOLISMO DEL GLUTATIÓN.....	62
2.12.11 FUNCIONES DEL GLUTATIÓN.....	63
2.12.13 METABOLISMO DEL GLUTATIÓN.....	63
2.12.14 EVENTOS BIOQUÍMICOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	64

2.12.15 DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR .....	65
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	67
3.1 MATERIAL VEGETAL .....	67
3.2 MEDIO DE CULTIVO .....	67
3.3 CALLOS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	68
3.3.1 EXTRACCIÓN DE TAXOIDES CON METANOL EN HOJAS Y CALLOS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> PARA ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (ENAKSHA <i>ET AL.</i> 1993) .....	69
3.3.2 EXTRACCIÓN DE TAXOIDES CON DICLOROMETANO EN HOJAS Y CALLOS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> PARA ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA .....	69
3.3.3 CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPTLC) DE TAXOIDES EN EL FOLLAJE DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	70
3.3.4 CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPTLC) EN CALLOS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	70
3.3.5 EXTRACCIÓN DE TAXOIDES EN CALLOS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	71
3.3.6 CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA DE ESTEROLES EN CALLOS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	71
3.4 CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	72
3.5 INOCULACIÓN DE CÉLULAS POR PESO.....	72
3.6 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	73
3.6.1 CRECIMIENTO CELULAR .....	73
3.7 ELICITACIÓN BIÓTICA Y COSECHA DE CÉLULAS .....	74
3.8 EXTRACCIÓN DE TAXOIDES .....	74
3.9 CONDICIONES ESTÁNDAR DE OPERACIÓN DEL CROMATÓGRAFO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TAXOIDES ..	75
3.10 VIABILIDAD CELULAR .....	75
LA VIABILIDAD CELULAR SE ANALIZÓ CON EL MÉTODO DE TINCIÓN QUE UTILIZA DIACETATO DE FLUORESCINA (FDA) POR EL MÉTODO REPORTADO POR WIDHOLM, 1972. LAS MUESTRAS CELULARES SE OBSERVARON BAJO UN MICROSCOPIO (CARL ZEISS, D-7082 MODELO MC80 CON LUZ POLARIZADA, OBERKOCHEN, GERMANY), 1 MIN DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE FDA. ....	75
3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	75
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	77
4.1 INDUCCIÓN DE CALLOS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	77
4.2 CONTENIDO DE TAXOIDES EN HOJAS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	78
4.3 CONTENIDO DE TAXOIDES EN CALLOS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	79
4.4 CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPTLC) DE TAXOIDES DEL FOLLAJE DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	80
4.5 ANÁLISIS DE TAXOIDES POR CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPTLC) A PARTIR DE CALLOS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	81
4.6 ANÁLISIS DE ESTEROLES Y TAXOIDES POR CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA (TLC) A PARTIR DE CALLOS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	81
4.7 CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	82
4.8 VIABILIDAD CELULAR EN CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	86
4.9 INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE TAXOIDES UTILIZANDO ELICITACIÓN EN CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>TAXUS GLOBOSA</i> .....	87
4.9.1 CRECIMIENTO CELULAR .....	88
CONCLUSIONES .....	106
REVISIÓN DE LITERATURA .....	107
APÉNDICE .....	118

## Lista de Cuadros

<b>CUADRO 1. CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO <i>TAXUS</i> SPP. ....</b>	<b>8</b>
<b>CUADRO 2. DIFERENCIAS ENTRE CULTIVOS MICROBIANOS Y SUSPENSIONES VEGETALES.</b>	<b>19</b>
<b>CUADRO 3. ANTECEDENTES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y CUANTIFICACIÓN DE TAXOIDES EN CALLOS DE <i>TAXUS</i> SPP. (ANTES DEL AÑO 2000). ....</b>	<b>23</b>
<b>CUADRO 4. ANTECEDENTES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y CUANTIFICACIÓN DE TAXOIDES EN CALLOS DE <i>TAXUS</i> SPP. (DESPUÉS DEL AÑO 2000). ....</b>	<b>23</b>
<b>CUADRO 5. TASA DE PRODUCCIÓN DE TAXOL EXTRACELULAR EN CULTIVOS CELULARES DE <i>TAXUS</i> SPP. (MODIFICADO DE FRENSE, 2007). ....</b>	<b>25</b>
<b>CUADRO 6. ANTECEDENTES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y CUANTIFICACIÓN DE TAXOIDES EN CÉLULAS DE <i>T. SPP.</i> (ANTES DEL AÑO 2000). ....</b>	<b>25</b>
<b>CUADRO 7. ANTECEDENTES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y CUANTIFICACIÓN DE TAXOIDES EN CÉLULAS DE <i>T. SPP.</i> (DESPUÉS DEL AÑO 2000). ....</b>	<b>26</b>
<b>CUADRO 8. GENERALIDADES DEL PACLITAXEL. ....</b>	<b>28</b>
<b>CUADRO 9. PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD GENERAL EN 2008 EN MÉXICO. ....</b>	<b>31</b>
<b>CUADRO 10. PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD EN MUJERES EN 2008 EN MÉXICO. ....</b>	<b>32</b>
<b>CUADRO 11. PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD EN HOMBRES EN 2008 EN MÉXICO. ....</b>	<b>32</b>
<b>CUADRO 12. PASOS PRINCIPALES DEL DESCUBRIMIENTO Y EL DESARROLLO DEL TAXOL COMO UN FÁRMACO ANTICÁNCER. ....</b>	<b>34</b>
<b>CUADRO 13. CLASIFICACIÓN DE ELICITORES. ....</b>	<b>53</b>
<b>CUADRO 14. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE GAMBORG <i>ET AL.</i>, (1968). ....</b>	<b>67</b>
<b>CUADRO 15. LISTA DE CONCENTRACIONES UTILIZADAS PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS DE <i>T. GLOBOSA</i>. ....</b>	<b>69</b>
<b>CUADRO 16. TRATAMIENTOS Y CONCENTRACIONES DE FITOHORMONAS UTILIZADAS PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS. ....</b>	<b>72</b>
<b>CUADRO 17. PORCENTAJE DE INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE ACÍCULAS. ....</b>	<b>77</b>
<b>CUADRO 18. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO (<math>\mu\text{G G}^{-1}</math> P. S.) DE TAXOIDES EN HOJAS DE <i>T. GLOBOSA</i>. ....</b>	<b>78</b>
<b>CUADRO 19. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO (<math>\mu\text{G G}^{-1}</math> P. S.) DE TAXOIDES EN CALLOS <i>IN VITRO</i> DE <i>T. GLOBOSA</i>. ....</b>	<b>79</b>
<b>CUADRO 20. RF DE LAS MUESTRAS DE EXTRACTO DE HOJAS DE <i>T. GLOBOSA</i> Y DE LOS ESTÁNDARES. ....</b>	<b>80</b>
<b>CUADRO 21. RF DE LAS MUESTRAS DE EXTRACTO DE CALLOS DE <i>T. GLOBOSA</i> Y DE LOS ESTÁNDARES. ....</b>	<b>81</b>
<b>CUADRO 22. RF DE LAS MUESTRAS DE EXTRACTOS DE CALLOS DE <i>T. GLOBOSA</i>, ESTEROLES Y ESTÁNDARES. ....</b>	<b>82</b>
<b>CUADRO 23. 10-DAB ACUMULADA EN CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>T. GLOBOSA</i> CONTROL Y ELICITADOS. ....</b>	<b>93</b>

<b>CUADRO 24. CEFALOMANINA ACUMULADA EN CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>T. GLOBOSA</i> CONTROL Y ELICITADOS.....</b>	<b>95</b>
<b>CUADRO 25. TAXOL ACUMULADO EN CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE <i>T. GLOBOSA</i> CONTROL Y ELICITADOS. ....</b>	<b>96</b>
<b>CUADRO 26. PROMEDIOS DE LA PRODUCCIÓN DEL TAXOIDE 10 DIACETIL BACCATINA Y DESVIACIONES ESTÁNDAR.....</b>	<b>101</b>
<b>CUADRO 27. PROMEDIOS DE LA PRODUCCIÓN DEL TAXOIDE CEFALOMANINA Y DESVIACIONES ESTÁNDAR.....</b>	<b>101</b>
<b>CUADRO 28. PROMEDIOS DE LA PRODUCCIÓN DEL TAXOIDE TAXOL Y DESVIACIONES ESTÁNDAR. ....</b>	<b>102</b>
<b>CUADRO 29. MEDIAS AJUSTADAS DE LOS TRATAMIENTOS.....</b>	<b>102</b>
<b>CUADRO 30. VALORES DE LOS COEFICIENTES DEL CRITERIO DE INFORMACIÓN DE AKAIKE (AIC) Y DEL CRITERIO BAYESIANO DE SCHWARZ (SBC) PARA LAS DIFERENTES MATRICES DE VARIANZA-COVARIANZA DEL ERROR EN LA PRODUCCIÓN DE TRES TAXOIDES.....</b>	<b>104</b>
<b>CUADRO 31. DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS AJUSTADAS EN TIEMPOS MEDIANTE EL MODELO MIXED. ....</b>	<b>104</b>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Aspecto físico del follaje de Taxus globosa y de las bayas (arilo carnoso de color rojo que envuelve a la semilla) Morales (2008).</i> .....	7
<i>Figura 2. Distribución geográfica mundial de las especies del género Taxus. Las especies T. brevifolia, T. canadensis, T. floridana y T. globosa se encuentran en América, la especie T. baccata en Europa y T. wallichiana, T. cuspidata y T. chinensis en Asia.</i> .....	12
<i>Figura 3. Distribución de T. globosa en la República Mexicana. N.L.: Nuevo León, T.: Tamaulipas, S.L.P.: San Luis Potosí, Q.: Querétaro, H.: Hidalgo, V.: Veracruz, O.: Oaxaca, CH.: Chiapas.</i> .....	13
<i>Figura 4. Uso médico actual del taxol en células cancerosas de: a) pulmón, b) seno, c) ovario, d) sarcoma de Kaposi de ganglio linfático. Fuente: National Geographic.</i> .....	31
<i>Figura 5. Estructura química del taxol. (ChemDraw, 2011).</i> .....	35
<i>Figura 6. Conformación polar (izquierda), conformación apolar (centro), y conformación en forma de T (derecha) de la molécula del taxol (Lakdawala et al., 2001).</i> .....	36
<i>Figura 7. Estructura química de la molécula del taxol (paclitaxel). C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub> P.M.: 853.90 (Expositó et al., 2009).</i> .....	36
<i>Figura 8. Imagen de la estructura del heterodímero de tubulina de protofilamentos de cerebro bovino (izquierda) determinado por cristalografía de electrones y un modelo metálico (derecha) muestra el paclitaxel y el GDP unido a β-tubulina, y GTP unido a α-tubulina se utilizaron en este modelo. Fuente: Las coordenadas se obtuvieron del banco de datos de proteínas Brookhaven (PDB código de identificación: 1JFF).</i> .....	39
<i>Figura 9. Mecanismo de polimerización de los microtúbulos. En la parte inferior del esquema se observa la modificación de los microtúbulos en presencia del taxol. (Centelles e Imperial, 2010).</i> .....	40
<i>Figura 10. Estructura química del anillo de taxano.</i> .....	42
<i>Figura 11. Formación del anillo de oxetano en la biosíntesis del taxol (Expositó et al., 2009).</i> .....	42
<i>Figura 12. Estructura general de los taxoides investigados en este trabajo, paclitaxel es el nombre genérico del taxol, el cual ha sido registrado como una marca de Bristol-Myers Squibb. Ac, grupo acetilo, Ph, grupo fenilo.</i> .....	43
<i>Figura 13. Esquema de la ruta de biosíntesis de los taxoides en Taxus spp. La ciclización de geranilgeranil difosfato a taxadieno por la enzima taxadieno sintasa y la hidroxilación a taxadien-5α-ol por la enzima taxadieno 5α-hidroxilasa (a), la acetilación de taxadien-5α-ol por la enzima taxa-4(20), 11 (12)-dien-5α-ol O-acetiltransferasa (TAT) (b), la conversión de 2-debenzoil "tipo-taxoide" intermediario a 10-deacetyl baccatina III por una enzima taxano 2α-O-benzoyltransferasa (TBT) (c), la conversión de 10-deacetyl baccatina III a baccatina III por la enzima 10-deacetyl baccatina III 10-O-acetiltransferasa (DBAT) (d), y el accesorio de la cadena lateral para baccatina III para formar taxol (e). La flecha discontinua indica que están por definirse estos pasos (Modificado de Heinig y Jennewein, 2009).</i> .....	44
<i>Figura 14. Conversión de 10-DAB III a baccatin III por la enzima 10-DAB acetil transferasa (Modificado de Heinig y Jennewein, 2009).</i> .....	47
<i>Figura 15. Modificaciones que pueden ocurrir en los grupos contenidos en la molécula de taxol (Expositó et al., 2009).</i> .....	48
<i>Figura 16. Efecto positivo del jasmonato de metilo sobre las actividades de las enzimas geranilgeranil pirofosfato sintasa y taxadieno sintasa en la ruta biosintética de los taxoides.</i> .....	55
<i>Figura 17. La acción positiva del elicitor MeJa sobre la biosíntesis del taxol (Modificado de Heinig y Jennewein, 2009).</i> .....	55
<i>Figura 18. Estructuras del jasmonato de metilo y las dos formas epiméricas del ácido jasmónico aislados de plantas. El (3R, 7S)-ácido jasmónico también es conocido como (+)-7-iso- o 7-epi-ácido jasmónico, es formado biosintéticamente, pero convertido en ácido o base a través de procesos de enolización al isómero trans más estable 3R, 7R-ácido jasmónico el cual es el isómero predominantemente extraído de tejidos intactos (Camarena, 2002).</i> .....	56

Figura 19. Esquema de los mecanismos de transducción de señales por medio de elicitores .....	57
Figura 20. Un modelo físico de transducción de señales de <i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i> inducida por un oligosacárido. G-P: proteína G, PLC: fosfolipasa C, PKC: proteína quinasa C.....	59
Figura 21. Estructura química de la molécula de butionina de sulfoximina. Fórmula molecular: C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S, masa molar: 222.305 g/mol (ChemDraw, 2011). .....	62
Figura 22. Representación de: A, glutatión reducido (GSH) y B, glutatión oxidado (GSSG). El GSH está constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. En el caso del GSSG son dos moléculas unidas por un puente disulfuro formado por las cisteínas (Martínez et al., 2011). .....	63
Figura 23. Estructura química del diacetato de fluoresceína, peso molecular: 416.39, fórmula molecular: C <sub>24</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> (ChemDraw, 2011). .....	66
Figura 24. Callos de <i>T. globosa</i> . a) explante, b) inducción de callo, c) y d) crecimiento de callo con PIC (PVP), e) oxidación de callo con PIC + NAA, f) callo con NAA. ....	78
Figura 25. HPTLC de muestras de extractos de hojas de <i>T. globosa</i> y estándares. Carril 1. Extracto de hojas de <i>T. globosa</i> ; Carril 2. Estándar de taxol; Carril 3. Estándar de 10 diacetil baccatina; Carril 4. Estándar de cefalomanina; Carril 5. Extracto de hojas de <i>Taxus</i> . ....	80
Figura 26. Aspecto físico de los inóculos iniciales en cultivos de células en suspensión de <i>T. globosa</i> . 1) NAA; 2) NAA/CIN; 3) NAA/BAP; 4) NAA/PIC y 5) PIC/PVP. ....	84
Figura 27. Aspecto físico final de los cultivos de células en suspensión de <i>T. globosa</i> a los días indicados después del cultivo. 1) NAA a los 35 d después del cultivo; 1a) NAA a los 14 d después del cultivo; 3) NAA/BAP a los 21 d después del cultivo; 3a) NAA/BAP a los 14 d después del cultivo; 4) NAA/PIC a los 13 días del cultivo y 5) PIC/PVP a los 21 d después del cultivo. Nota: el cultivo de NAA/CIN se eliminó por la oxidación. ....	85
Figura 28. Aspecto físico de los cultivos de células en suspensión de <i>T. globosa</i> con ácido naftalen acético y picloram utilizados en este trabajo. ....	85
Figura 29. Células en medio B5 con: a) NAA (ácido naftalenacético)/BAP (Bencil amino purina); b) células en medio NAA (ácido naftalen acético/PIC (picloram) y c) células en medio NAA (ácido naftalen acético). ....	87
Figura 30. Peso seco (mg) de las células control y elicidadas con jasmonato de metilo, etanol-1, etanol-2 y la combinación de butionina de sulfoximina y peróxido de hidrógeno. Los datos son el promedio de 2 repeticiones. Barras indican la desviación estándar. ....	88
Figura 31. Determinación del pH en el medio de cultivo. Células control y elicidadas con jasmonato de metilo, etanol-1, etanol-2 y butionina de sulfoximina con peróxido de hidrógeno. Barras representan la desviación estándar. ....	90
Figura 32. Determinación del volumen de medio consumido. Células control y elicidadas con jasmonato de metilo, etanol-1, etanol-2 y butionina de sulfoximina con peróxido de hidrógeno. Barras representan la desviación estándar. ....	91
Figura 33. Efecto de la aplicación de los elicitores: jasmonato de metilo, etanol (EtOH) y la combinación de butionina de sulfoximina (BSO) y peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) en la producción de 10-diacetil baccatina, expresado como µg g <sup>-1</sup> de peso seco, en cultivos de células de <i>Taxus globosa</i> . Los datos son el promedio de 2 repeticiones. Barras indican la desviación estándar. ....	92
Figura 34. Efecto de la aplicación de los elicitores: jasmonato de metilo, etanol (EtOH) y la combinación de butionina de sulfoximina (BSO) y peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) en la producción de cefalomanina, expresado como µg g <sup>-1</sup> de peso seco, en cultivos de células de <i>Taxus globosa</i> . Los datos son el promedio de 2 repeticiones. Barras indican la desviación estándar. ....	95
Figura 35. Efecto de la aplicación de los elicitores: jasmonato de metilo, etanol (EtOH) y la combinación de butionina de sulfoximina (BSO) con peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) en la producción de taxol de células de <i>Taxus globosa</i> . Los datos son el promedio de 2 repeticiones. Barras indican la desviación estándar. ....	96

## I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son la fuente principal de alimentos y de metabolitos secundarios, estos compuestos, que pueden ser fármacos, insecticidas, saborizantes, colorantes y aromas, se utilizan como materias primas o principios activos en la industria química, farmacéutica, agrícola y alimentaria. Debido a la sobreexplotación de las fuentes naturales, muchas especies vegetales están en peligro de extinción. Por tanto, es necesario, obtener estos compuestos con técnicas alternativas a las naturales, como el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales *in vitro*, que han sido investigadas ampliamente durante los últimos 30 años.

La familia Taxaceae, está representada en México por el género *Taxus* con una sola especie, *T. globosa*, la cual se distribuye en la Sierra Madre Oriental (en Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Veracruz), Sierra Madre de Juárez, Oaxaca, Meseta Central de Chiapas, México. se extiende a la Sierra de Minas, Sierra de Cuchumatanes y cadena volcánica en Guatemala, en el sur de El Salvador y en las cordilleras de Celaque y Tilarán en Honduras. Esta especie habita principalmente en los bosques mesófilos de montaña de México (Contreras, 2001).

El tejo mexicano (*T. globosa*) produce un pseudoalcaloide diterpénico polioxigenado llamado taxol, que se usa en el tratamiento del cáncer cérvico uterino (Soto *et al.*, 2000), de seno, pulmón y ovario y en el sarcoma de Kaposi, relacionado con el AIDS (Ting, 2008).

Los taxoides diterpenoides se biosintetizan principalmente por los miembros del género *Taxus* y representan uno de los grupos interesantes de productos naturales bioactivos debido al descubrimiento y desarrollo del taxol, el cual ha sido un agente terapéutico eficiente y la mejor medicina comercial anticáncer en la historia (Kingston, 2000). En Estados Unidos se cultivan al menos 16 variedades de *T. baccata* L. (especie europea) y *T. cuspidata* Siebold &

Zucc. (especie asiática) como fuente de materia prima para usos medicinales (Hansen *et al.*, 1994).

El taxol fue aislado inicialmente por Wani *et al.* (1971) de la corteza del árbol de Tejo del Pacífico (*T. brevifolia* Nutt); debido a que esta especie es de crecimiento lento, la fuente natural de taxoides es limitada. El taxol es un compuesto antitumoral que se encuentra en concentraciones de  $5.0 \times 10^{-1}$  de la biomasa seca de la planta.

El cultivo masivo de células vegetales se ha propuesto como una alternativa para la producción de metabolitos secundarios (Sharp y Dorán, 2001). Esta técnica ha sido estudiada para la obtención de compuestos fitoquímicos que tienen actividad antimicrobiana, antibiótica o insecticida. Además, presenta ventajas amplias en comparación con la producción agrícola convencional, ya que es independiente de la geografía, variaciones estacionales y ambientales e interferencias políticas, pueden suministrar un producto de calidad uniforme o utilizarse para procesos de biotransformación (Ramachandra y Ravishankar, 2002).

El cultivo de células vegetales a partir de callos cultivados *in vitro* es una fuente sustentable para la producción de metabolitos de valor agregado alto en aplicaciones medicinales como el taxol (Naill y Roberts, 2004). Phyton Biotech Inc. y Samyang Genex Corp. iniciaron la producción industrial de taxol, para su comercialización, con fermentación a gran escala (Zhang *et al.*, 2002). Las principales dificultades primarias asociadas con el establecimiento de los bioprocesos de cultivos de células vegetales de *Taxus* spp. han sido el rendimiento bajo y variable de sus metabolitos secundarios. Con el fin de incrementar los rendimientos se ha utilizado la elicitación como una estrategia de investigación con beneficios importantes en la industria farmacéutica. En general, un elicitador son moléculas y/o estímulos que inducen o controlan la expresión de genes y de rutas del metabolismo. Algunos metales pesados (cobre,

cadmio, cromo), jasmonatos y compuestos fúngicos se han utilizado para incrementar la producción de metabolitos secundarios. Nadmeo (2007) indica que la elicitación es un proceso que induce la síntesis de metabolitos secundarios de las plantas para garantizar su supervivencia, persistencia y competitividad. Schaller y Stintzi (2009) mencionan que los jasmonatos se originan en las membranas de los cloroplastos a partir de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados, y describe descubrimientos recientes de su estructura, función, y regulación de las enzimas implicadas en la biosíntesis de los jasmonatos.

El objetivo de este estudio fue: establecer un método de propagación *in vitro* de callos y de cultivo de células en suspensión, y a partir de los extractos se realizaron ensayos de cromatografía en capa fina de alta resolución a extractos de callos; pruebas de viabilidad celular y se elicitaron suspensiones celulares con jasmonato de metilo, etanol y una combinación de peróxido de hidrógeno con butionina de sulfoximina. Se cuantificaron tres taxoides: taxol, cefalomanina y 10-diacetil baccatina mediante cromatografía líquida de alta resolución en a partir de los extractos de cultivos *in vitro* de callos, células elicitadas y hojas de *T. globosa*.

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

La escasez de *T. globosa* ha llamado la atención debido a que aparentemente es un recurso genético que puede estar en peligro, en caso de que no se logre su conservación *ex situ* y se promueva su permanencia *in situ*. La producción del taxol, compuesto con demanda alta por su actividad citotóxica es un ejemplo de fármaco que se obtiene de plantas cuya demanda es difícil de abastecer. Para obtener 1 kg de taxol se necesita la corteza de 1000 árboles de *Taxus brevifolia* L. Los constituyentes fitoquímicos de diferentes especies de *Taxus* han sido estudiados durante varias décadas y se han identificado: taxanos-alcaloides, diterpenos con esqueleto de taxano, lignanos, biflavonoides, esteroides y diterpenos. Entre ellos, los taxoides antitumorales y diterpenos antineoplásicos han generado gran interés farmacológico y destaca ampliamente el taxol, un diterpeno tetracíclico, oncofármaco utilizado para fines terapéuticos en el tratamiento del cáncer cérvico uterino, seno, pulmón, carcinoma gástrico, así como los taxoides: 10-diacetil baccatina y cefalomanina. Por tanto, se considera necesaria en esta investigación la producción y obtención de tres taxoides a partir de cultivos de líneas celulares altamente productoras de *T. globosa* Schlecht. Por otro lado, pocas son las investigaciones sobre la generación de líneas celulares a partir de la especie mexicana de *T. globosa* siendo necesario desarrollar una alternativa biotecnológica del cultivo *in vitro* como una alternativa atractiva.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.3 Objetivo General

Establecer un cultivo *in vitro* de callos y de células de *Taxus globosa* como fuente accesible para la obtención de tres taxoides: 10-deacetil baccatina, cefalomanina y taxol.

### 1.4 Objetivos Específicos

- 1.- Inducir callos por cultivo *in vitro* y analizar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) el contenido de tres taxoides: 10-diacetil baccatina, cefalomanina y taxol en cultivos *in vitro* de callos de *T. globosa* así como en hojas *in situ*.
- 2.- Realizar la identificación de los taxoides 10-diacetil baccatina, cefalomanina y taxol en cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) en hojas y callos de *T. globosa*.
- 3.- Realizar la identificación de esteroides en cromatografía en capa fina (TLC) de callos de *T. globosa*.
- 4.- Realizar pruebas de viabilidad celular a los cultivos de células en suspensión.
- 5.- Elicitar los cultivos de células en suspensión con jasmonato de metilo, etanol, y una combinación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y butionina de sulfoximina (BSO).
- 6.- Determinar mediante HPLC la producción de taxoides en los cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión de *T. globosa* con y sin elicitación.

## 1.5 HIPÓTESIS

La adición de elicitores en cultivos *in vitro* de células de *T. globosa* incrementará la producción de los taxoides 10-diacetil baccatina, cefalomanina y taxol.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Antecedentes históricos del tejo

La toxicidad del árbol del tejo (*Taxus spp.*) y su extraordinaria longevidad, que le hace parecer inmortal, ha hecho que, desde tiempo inmemorial, fuese considerado como un árbol sagrado. Así los pueblos celtas lo veneraban y sus sacerdotes, los druidas, lo usaban en sus rituales. Otros pueblos de la península ibérica como los antiguos cántabros y astures, así como algunos de los pobladores de la Galia, lo utilizaban como veneno cuando eran capturados por sus enemigos (Centelles e Imperial, 2010).

La importancia de este árbol a lo largo de la historia ha quedado reflejada también en la geografía. Los topónimos de pueblos españoles que derivan del tejo son numerosos, como Teixeiro, Teixido o El Tejo. Estos pueblos le deben su nombre y son un reflejo de la importancia que tuvo el árbol en épocas pasadas. Sus propiedades curativas son conocidas desde hace milenios. El emperador romano Claudio publicó un edicto en el que señalaba al tejo como el mejor antídoto contra las picaduras de las serpientes. A lo largo de la historia se ha usado también como abortivo (Centelles e Imperial, 2010).

## 2.2 Taxonomía y descripción

El tejo es una gimnosperma que se encuadra en una familia de plantas muy antiguas, las Taxáceas. El género *Taxus* (Cuadro 1) pertenece a la clase Pinopsida, orden Taxales y a la familia Taxaceae (Malik *et al.*, 2011).

Tienen cierta similitud con las coníferas, otra familia de gimnospermas a la que pertenecen los pinos, abetos, cedros y otros. Sin embargo las taxáceas se distinguen de las coníferas en que su madera y sus hojas no tienen canales resiníferos y en que sus semillas no se encuentran dentro de conos (las piñas), sino que aparecen rodeadas por una envoltura carnosa que les da aspecto de baya (Figura 1).



Figura 1. Aspecto físico del follaje de *Taxus globosa* y de las bayas (arilo carnoso de color rojo que envuelve a la semilla) Morales (2008).

En la actualidad el género *Taxus* agrupa varias especies semejantes entre sí, que se distinguen por su origen geográfico más que por sus características morfológicas. Algunos de los parientes del tejo mexicano (*T. globosa* Schle.) son: el tejo europeo (*T. baccata* L.), el tejo japonés (*T. cuspidata* Siebold y Zucc.), el tejo americano (*T. canadensis* Marshall) y el tejo del Pacífico (*T. brevifolia* Nutt), característico del oeste de los EE.UU.

Cuadro 1. Clasificación del género *Taxus* spp.

Nombre común	Nombre científico
Tejo europeo	<i>T. baccata</i> L.
Tejo del Himalaya	<i>T. wallichiana</i> Zucc.
Tejo chino	<i>T. celebica</i> Li.
Tejo japonés	<i>T. cuspidata</i> Sieb et Zucc.
Tejo del Pacífico	<i>T. brevifolia</i> Nutt.
Tejo mexicano	<i>T. globosa</i> Schlechtd.
Tejo de la Florida	<i>T. floridana</i> Nutt.
Tejo canadiense	<i>T. canadensis</i> Marsh.

### 2.3 Usos y tradiciones

Desde la antigüedad, los tejos han sido considerados árboles sagrados y temibles. Sagrados a causa de su permanente verdor y longevidad, por lo que se les consideraba un símbolo de vida eterna, y temibles, por su toxicidad y su follaje oscuro y sombrío. De hecho, los pueblos celtas construían sus templos y altares cerca de estos árboles sagrados, una costumbre que luego fue heredada por los primeros cristianos. Aún hoy es posible encontrar al pie de tejos europeos centenarios algunas ermitas e iglesias que se edificaron en estos lugares mágicos, siguiendo la tradición celta (Iglesias *et al.*, 1997).

### 2.4 Uso medicinal

Desde tiempos inmemoriales se ha sabido de la toxicidad y de las propiedades medicinales del tejo. Se afirma que los galos envenenaban sus flechas con “zumo” de tejo, y en el sexto libro de la Guerra de las Galias, Julio César relata que Cativolco, rey de un pueblo celta, se quitó la vida con “zumo” de tejo para no caer en poder de los romanos. La medicina

tradicional de occidente atribuye a esta planta efectos emenagogo, pectoral, narcótico y abortivo; las tribus americanas usaban brebajes de tejo (*T. brevifolia*) para tratar el reumatismo, la fiebre y la artritis; y los japoneses empleaban las hojas de tejo (*T. cuspidata*) para tratar la diabetes y para inducir abortos (Iglesias *et al.*, 1997).

## **2.5 Especie en regresión**

Los cinco géneros que constituyen en la actualidad la familia de las taxáceas derivan de la especie fósil *Paleotaxus rediviva*, de la que se han encontrado restos en sedimentos del Triásico con una antigüedad de 200 millones de años. La aparición de las especies actuales de tejo es más reciente (López, 2001).

Los tejos debieron ser especies muy abundantes durante el Pleistoceno, el periodo de las glaciaciones cuaternarias. Los estudios de polen fósil indican que en esta época, el tejo, estaba ampliamente distribuido en Europa y, muy posiblemente, era una especie fundamental en los bosques. Los cambios ocurridos en las condiciones climáticas, a lo largo de este amplio periodo de tiempo, fueron convirtiendo al tejo en especie residual a la vez que favorecieron el desarrollo de otras especies, que hoy dominan las formaciones arbóreas, quedando el tejo relegado a pequeñas manchas dispersas. Esto explicaría su amplia distribución actual, en numerosos y pequeños núcleos relícticos dispersos en la mitad norte del planeta, sin que, en la mayoría de los casos, lleguen a formar bosques (López, 2001).

Por tanto el declive del tejo obedece, en parte, a causas naturales, considerándose que es una especie que se encuentra en un periodo de regresión evolutiva. Sin embargo, este proceso de regresión natural, que se ha producido de forma lenta y paulatina durante muchos miles de años, está siendo acelerado de forma dramática por la actuación del hombre, y puede dar lugar a la desaparición definitiva de la especie en muchas regiones sino se adoptan medidas eficaces de protección (López, 2001).

En las actuales condiciones ambientales el tejo se encuentra en un periodo de declive evolutivo. Las exigencias de humedad edáfica, la lentitud de su crecimiento, las bajas tasas de germinación de sus semillas y la existencia, en esta especie, de estróbilos masculinos y estróbilos femeninos influyen negativamente en su capacidad de adaptación (López, 2001).

La floración de los tejos se produce con regularidad pero no siempre está asegurada la formación de semillas. Para que esto suceda es necesario que los árboles masculinos estén lo bastante cerca de árboles femeninos para que se pueda llevar a cabo la polinización, producida por el viento. Como las poblaciones de tejo están cada vez más aisladas unas de otras, y en muchos casos están representadas por uno o unos pocos individuos, la reproducción de la especie se ve muy dificultada (López, 2001).

Por otra parte, el tejo mantiene un follaje denso y verde durante todo el año lo que le convierte en refugio y alimento invernal de numerosas especies animales. Aves, roedores y pequeños carnívoros consumen sus frutos, y los rumiantes (ciervos, corzos, cabras, vacas) ramonean las hojas que quedan a su alcance. Las pocas semillas de tejo que logran germinar dan lugar a plantas que se desarrollan muy lentamente y son consumidas por los rumiantes tanto domésticos como salvajes. Esto contribuye, también, a que la regeneración natural del tejo es sumamente escasa y a que no aparezcan nuevos árboles, capaces de garantizar la persistencia de las poblaciones a largo plazo (López, 2001).

## **2.6 Características botánicas de *Taxus globosa* (Schlecht.)**

El género *Taxus* se ubica en la división gimnospermas, phylum coníferas, orden taxales y familia Taxaceae (Farjon, 1998). Florece de enero a marzo y fructifica de mayo a noviembre, su regeneración natural se basa en las semillas aunque produce rebrotes del tallo, lo que puede ser un potencial de propagación vegetativa importante. Al igual que otras especies de

este género, es una planta venenosa en todas sus partes excepto el arilo, el cual es atractivo, de color rojo, y comestible para aves (Zavala, 2001).

El tejo es un árbol que puede alcanzar un gran tamaño, una altura de hasta 20 m y un tronco de hasta 1.5 m de diámetro. Además de por su tamaño, el tejo destaca porque es muy longevo: algunos ejemplares han superado los 1500 años de vida y se consideran los árboles más antiguos de Europa. Las hojas del tejo son perennes, tienen entre 10 y 30 mm de longitud y están dispuestas en dos hileras opuestas, de color verde oscuro por la cara superior y amarillenta por el envés. Su fruto es carnoso y de un color rojo vivo y brillante. Otra particularidad interesante del tejo es que tanto las hojas, las ramas como la madera contienen alcaloides muy tóxicos, denominados en su conjunto taxinas o taxanos, que actúan sobre el sistema nervioso central, paralizándolo. De hecho en el tejo todo es venenoso salvo la envoltura roja que rodea el fruto. La ingestión de tejo causa en un principio la aceleración del pulso cardíaco, y después éste se va volviendo más lento e irregular hasta que finalmente se produce la muerte por parálisis respiratoria (Centelles e Imperial, 2010).

## **2.7 Distribución geográfica**

La distribución del género *Taxus* en Norteamérica y Eurasia es extensa, aunque raramente abundante. Estos árboles se encuentran en ambientes generalmente húmedos, en los bosques templados en el hemisferio norte, pero también se encuentran en algunas áreas subtropicales y tropicales de Asia Sur-Oriental y de América Central. En el hemisferio meridional se encuentran en Sumatra y las islas Célebes. El tejo inglés, *T. baccata* es nativo de Europa y África del Norte. *T. cuspidata* o tejo japonés, es nativo del este de Asia (China, Japón, Corea y partes de Rusia). El tejo himalayano, *T. wallichiana* crece del este de Afganistán al Tíbet y a China. En América del Norte y central, cuatro especies nativas de *Taxus* son reconocidas por su localización geográfica. El tejo del pacífico (tejo occidental), *Taxus brevifolia*, se

distribuye extensamente en partes occidentales de Canadá y de los Estados Unidos. El tejo del pacífico crece desde Alaska hasta las montañas de Sierra Nevada en California, especialmente en las cascadas Ranges de Washington y Oregon. En las montañas rocosas, crece de la Columbia Británica hasta Idaho y Montana. El tejo de la florida, *T. floridana*, es endémico del norte de Florida. El tejo canadiense, *T. canadensis*, crece de Terranova a Manitoba y del sur de Iowa a Carolina del Norte (Figura 2).

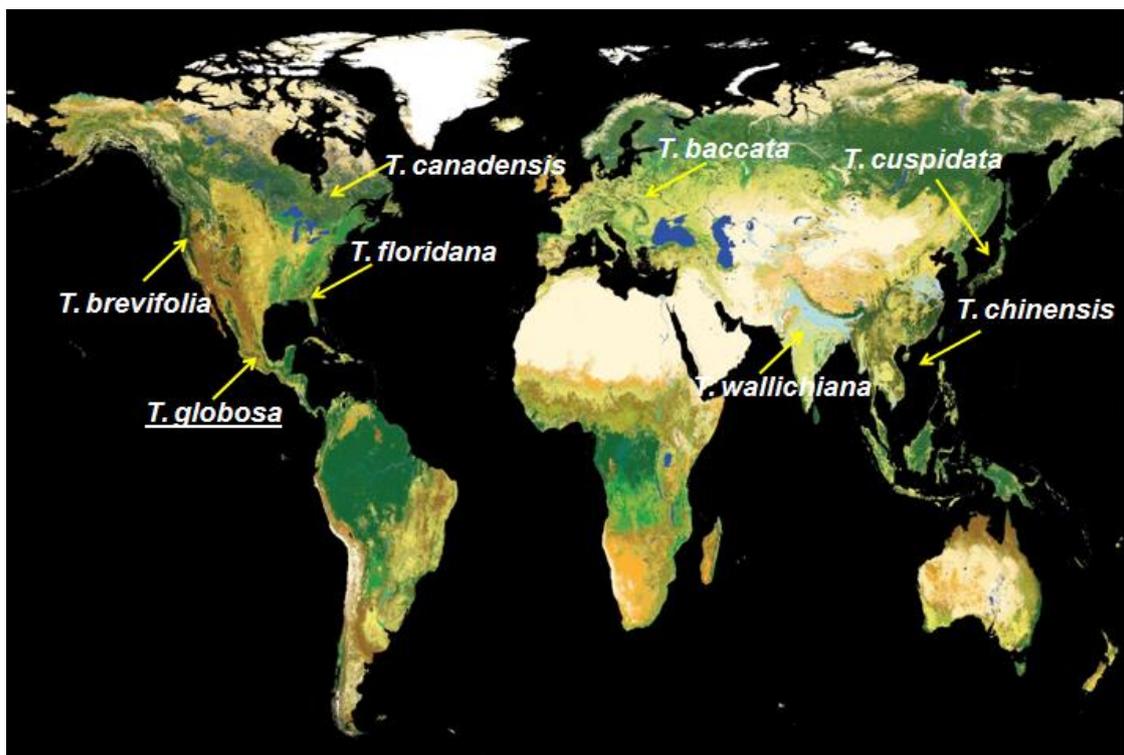


Figura 2. Distribución geográfica mundial de las especies del género *Taxus*. Las especies *T. brevifolia*, *T. canadensis*, *T. floridana* y *T. globosa* se encuentran en América, la especie *T. baccata* en Europa y *T. wallichiana*, *T. cuspidata* y *T. chinensis* en Asia.

La especie es también conocida como granadillo, palmira, romerillo y tlatscal, fue descrita por Schelectendal en 1938 pero prácticamente no existen documentos sobre ello. De los cuatro tejos nativos del hemisferio occidental, el menos conocido es el tejo mexicano, *T. globosa* (Ramesh, 1998). Se le encuentra esporádicamente, en Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Querétaro, Hidalgo, Oaxaca y Chiapas, hasta Guatemala, Honduras y

El Salvador (Guerrero, 2000) (Figura 3). Se ha observado que existe una significativa variación en el contenido de taxanos de los árboles del género *Taxus*. Factores que influyen en esta variación son la localización geográfica, medio ambiente y actividad agrícola de las localidades (Wheeler *et al.*, 1992).



Figura 3. Distribución de *T. globosa* en la República Mexicana. N.L.: Nuevo León, T.: Tamaulipas, S.L.P.: San Luis Potosí, Q.: Querétaro, H.: Hidalgo, V.: Veracruz, O.: Oaxaca, CH.: Chiapas.

Es una especie extremadamente rara en cultivo y está incluida en el listado de especies sujetas a protección especial por la SEMARNAT en México (NOM-ECOL-059-2001). Se le encuentra en altitudes aproximadas de 1500 a 2700 m en asociación con otras especies. Los tejos crecen en áreas húmedas, y sombrías en donde la abundancia de mohos de agua (específicamente, ficomicetos) podrían causar que las raíces del árbol se pudriesen. El taxol producido por los tejos inhibe el crecimiento y desarrollo de estos mohos, impidiendo que

éstos pudran las raíces del árbol (Strobel, 1993). Existen muy pocos estudios de *T. globosa* que enfoquen su interés en el taxol. En unos cuantos casos se ha reportado el contenido de taxol en poblaciones de *T. globosa* en México (Nicholson *et al.*, 2003; Soto, 2000).

## **2.8 Generalidades del cultivo *in vitro***

A lo largo del tiempo las plantas han sido de gran importancia, debido a que representan una fuente de alimentos y de compuestos medicinales. Las plantas son todavía la fuente principal de una gran cantidad de compuestos químicos, incluyendo fármacos, insecticidas, saborizantes, colorantes, fragancias y proteínas. La mayoría de estos compuestos se obtienen de plantas cultivadas en grandes extensiones de terreno, aunque el cultivo de células vegetales es considerado como una alternativa para la producción de dichos compuestos (Dixon y Gonzales, 1994; Kieran *et al.*, 1997).

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permite el cultivo *in vitro* de cualquier parte de una planta (tallos, hojas, raíces, meristemos) desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones asépticas y controladas. Los cinco tipos de cultivos de tejidos vegetales más importantes son: cultivo de la planta completa, cultivo de embriones, cultivo de órganos, cultivo de callos y cultivo de células en suspensión (células aisladas o pequeños agregados) (Sajc *et al.*, 2000).

Las ventajas que presenta el cultivo de células vegetales con respecto al cultivo tradicional de la planta completa son (Topete *et al.*, 1991):

1. Independencia de las condiciones climáticas adversas y de los problemas de plagas.
2. Control del suministro del producto independiente de la disponibilidad de la planta.
3. Sistemas de producción bajo condiciones controladas y optimizadas.

4. Producción más consistente en cuanto a calidad y rendimiento del producto.
5. Es posible lograr mejores rendimientos con respecto a los obtenidos por el cultivo de la planta completa.
6. Mínimas necesidades de espacio para el desarrollo de la producción.
7. Población celular uniforme y facilidad de extracción del producto.

Debido a lo anterior, el cultivo de estas células representa una alternativa biotecnológica tanto para la producción *in vitro* de metabolitos primarios como de metabolitos secundarios.

## **2.9 Reguladores de crecimiento vegetal**

En el cultivo de células vegetales son fundamentales los reguladores del crecimiento vegetal (RCV), los cuales son compuestos orgánicos, distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico en las plantas (Hurtado y Merino, 1987).

Se reconocen 5 tipos básicos de sistemas químicos reguladores del crecimiento vegetal, divididos en tres grupos principales (Hurtado y Merino, 1987):

- a) Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas.
- b) Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- c) Promotor de la maduración de los frutos y senescencia de las hojas: etileno.

Los RCV más utilizados en los cultivos *in vitro* son las auxinas y las citocininas, pues son los que regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo organizado en los cultivos de tejidos vegetales (Hurtado y Merino, 1987).

Las auxinas (del griego *auxein*, crecer) son un grupo de compuestos, derivados del triptófano, que controlan el crecimiento de las plantas. Se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo, aunque las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas. Afectan el crecimiento del tallo, las hojas y las raíces, así como el desarrollo de ramas laterales y frutos. Las auxinas influyen en el crecimiento de estos órganos vegetales estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución (Palme y Galweiler, 1999).

Las citocininas son purinas sustituidas; son derivados de la adenina con un sustituyente, el cual puede ser isoprenoide (citocininas isoprenoídicas) o aromático (citocininas aromáticas), en el nitrógeno amínico de la posición 6. Las citocininas se sintetizan en los meristemas apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en los frutos. En las plantas, promueven el crecimiento debido a que estimulan la división celular, lo cual las hacen muy útiles para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Sylvester, 2000).

La mayoría de las auxinas y citocininas que se usan con más frecuencia en el cultivo de células vegetales son sintéticas. Los inhibidores del crecimiento y el etileno son poco utilizados en el cultivo de tejidos vegetales. Las giberelinas se emplean en algunas especies para obtener plantas libres de virus, sin embargo su adición en el medio de cultivo no es crítica (Dixon y González, 1994).

### **2.9.1 Cultivo de callos**

Un callo es el crecimiento *in vitro* de una estructura vegetal amorfa, por lo general clorofílica, que se forma a partir de un fragmento de tejido, colocado sobre un soporte sólido con un medio de cultivo adecuado (Steward *et al.*, 1964).

El cultivo de callos se puede dividir en las siguientes etapas:

- a) Inducción. Las células del inóculo inicial comienzan su crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- b) Proliferación celular. El tejido calloso aumenta su masa celular al máximo.
- c) Inducción de la diferenciación. Se obtienen meristemos, embriones, tejido vascular, a partir de la masa celular del callo.
- d) Envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.

La inducción constituye la activación del metabolismo, caracterizándose por un tamaño constante de célula. La duración de esta fase varía con el estado fisiológico de las células del explante, la presencia de fitoreguladores, y con las condiciones físicas y ambientales empleadas en el cultivo. La inducción de tejido calloso se produce cuando la proporción de auxinas es superior a la de citocininas. Las auxinas son las responsables de la aparición de este tipo de tejido, mientras que las citocininas sólo favorecen su proliferación. En ciertas especies la inducción de tejido calloso puede lograrse agregando únicamente auxinas al medio de cultivo (Pérez *et al.*, 1999).

La desdiferenciación y la división celular se definen por los cambios en el tamaño, estructura y metabolismo de las células, siendo su propósito la formación de la estructura vegetal amorfa, es decir el callo mismo. El callo presenta un crecimiento exponencial de naturaleza radial, con una duración aproximada de 3 a 4 semanas antes de alcanzar la fase estacionaria. Por otro lado, en el transcurso del proceso de desdiferenciación, las células vegetales conservan la capacidad de mantener activas todas sus funciones metabólicas, de manera indistinta al tejido de su procedencia, llamándose totipotencia a esta condición (Steward *et al.*, 1964).

Otras características importantes, aunque no sean fases o etapas del cultivo *in vitro*, tienen que ver con procesos de naturaleza selectiva, tal como la presencia de grupos celulares que manifiestan variaciones genotípicas y/o fenotípicas, fenómeno conocido como variación somaclonal. Otro asunto relevante que altera las condiciones del cultivo, son la muerte y oxidación de regiones de la estructura callosa, así como la contaminación por el crecimiento y desarrollo de microorganismos (hongos y bacterias, principalmente). Debe mencionarse que la inducción originada a partir de los diferentes tejidos vegetales del explante, permite seleccionar al eventual cultivo celular que exprese *in vitro*, las características deseadas que deberán permanecer estables bajo condiciones nutricionales y ambientales dadas (Murashige, 1974).

### **2.9.2 Crecimiento de callos y suspensiones celulares**

Los cultivos de callos son a menudo de crecimiento lento y heterogéneo debido fundamentalmente a la disponibilidad vectorial de los nutrientes. Son masas celulares cuya morfología raramente provee características que permitan la selección de líneas de interés (Warren, 1992). Para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en periodos cortos, variables según la especie (30 a 45 días). La tasa de crecimiento y las características de friabilidad dependen de las especies, del balance hormonal, de la concentración de agar, calcio y magnesio y de la intensidad luminosa (Gomez, 1998).

El mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares es un callo friable, formado por células indiferenciadas y con baja cohesividad entre ellas. Si se requiere utilizar otro tipo de callos es necesario romper los agregados celulares por medios mecánicos o enzimáticos. Un cultivo con cúmulos de diferentes tamaños manifiesta comportamientos erráticos debido posiblemente a la diferencia de microambientes (Scragg, 1992).

Aunque los cultivos de células en suspensión son generalmente considerados semejantes a los de los microorganismos, cada tipo de cultivo presenta particularidades (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diferencias entre cultivos microbianos y suspensiones vegetales.

<b>Característica</b>	<b>Cultivos microbianos</b>	<b>Suspensiones vegetales</b>
Tamaño celular	1-2 x 2-10 $\mu\text{m}$	20-40 x 20-200 $\mu\text{m}$
Agregados	Generalmente no	Frecuentes
Tiempo de duplicación	< 2 horas	> 24 horas
Contenido de agua	75-80%	90-95%
Densidad del inóculo	Baja	Alta (5-10%)
Consumo de oxígeno	Alto	Bajo
Estabilidad	Generalmente estable	Inestable
Producción de espuma	Si	Si
Sensibilidad a la fuerza de corte (agitación)	No, con excepción de los hongos filamentosos	Si
Producto	A menudo extracelular	Comúnmente intracelular (vacuola)

Ertola *et al.*, 1994.

### 2.9.3 Heterogeneidad y variación somaclonal

Al iniciarse un cultivo se produce una división asincrónica de los diferentes tipos celulares que forman el explante y una selección debida a que las células difieren en su adaptación a las condiciones de cultivo. Esto determina una heterogeneidad inherente al cultivo de tejidos vegetales, aunque es posible, después de varias generaciones, obtener cultivos más homogéneos pero probablemente diferentes a los parentales (Llorente, 2000).

El cultivo de tejidos indiferenciados puede presentar, además, un amplio espectro de variaciones. Es así que se han observado anomalías cromosómicas como deleciones, fusiones, cambios en la ploidía y variaciones en el número y tamaño. Lee y Phillips (1988), atribuyen estos reajustes cromosómicos a una replicación tardía de la heterocromatina o a un desequilibrio en el pool de nucleótidos como consecuencia de los ciclos de transferencia desde medios de cultivo agotados a medios frescos.

#### **2.9.4 Aplicaciones de los cultivos en suspensión**

Una suspensión celular puede definirse, como un conjunto de células individuales y/o agregados celulares de tamaño variable (1 a 2 mm, por lo general), que crecen y se desarrollan en un medio líquido dentro del cual se hallan dispersas, y que se encuentran incubadas a temperatura y agitación constantes. En su elaboración se emplean inicialmente callos fácilmente disgregables o friables (Constantin *et al.*, 1982).

Durante su desarrollo, las células presentan las mismas fases de crecimiento obtenidas en el cultivo de callos (fase de adaptación o fase lag, crecimiento exponencial y fase estacionaria), pero en un tiempo presuntamente más corto, ya que los fenómenos de transferencia de masa facilitados por una adecuada aireación y agitación, posibilitan una mayor velocidad de crecimiento, al incrementarse la disponibilidad de gases y nutrientes (Lane, 1982). Posteriormente, los cultivos en suspensión son mantenidos bajo un régimen de Subcultivos, preferentemente durante la etapa de crecimiento exponencial, empleando medios y condiciones adecuadas, es posible el establecimiento y desarrollo de nuevas líneas celulares, procesos que la técnica de crioconservación de este tipo de material, por sí misma, no puede ofrecer. Por lo tanto, para los estudios de investigación deben tenerse en cuenta el número de resiembras, ya que al paso del tiempo las células tienden a envejecer y disminuir vitalidad metabólica (Street, 1977).

Una condición que resulta importante mantener, como en el caso de cultivo de callos, es el control y, si es posible, la eliminación definitiva de la contaminación por microorganismos. Por último, para considerar establecida una suspensión celular, deben especificarse por lo menos los siguientes parámetros: medio de cultivo, condiciones ambientales, el tamaño del inóculo (Quintero, 1981).

Los cultivos de suspensiones vegetales tienen un amplio rango de aplicaciones constituyendo una técnica muy valiosa en los estudios sobre: 1) la regulación del ciclo celular, 2) la replicación del ADN y la síntesis de proteínas, 3) la transferencia de material genético, 4) la absorción y transporte de nutrientes, 5) los diferentes eventos metabólicos, 6) la producción de metabolitos de interés en las industrias alimenticias, de fragancias y farmacéuticas, 7) el aislamiento y la selección de mutantes, 8) los procesos de diferenciación y desarrollo de los embriones resultantes de la embriogénesis somática (Szabados *et al.*, 1991).

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión puede lograrse directamente a partir de un inóculo, o bien transfiriendo un fragmento de callo al medio líquido, el cual se mantiene en agitación durante el periodo de cultivo (Morales, 2008). Después de la inoculación del tejido calloso en el medio líquido agitado, se inicia un periodo de fragmentación en pequeños agregados que producen células libres y nuevos grupos de células. El crecimiento del cultivo suele presentar un comportamiento sigmoideo, mostrando las fases características del crecimiento de microorganismos (Zhao *et al.*, 2001).

Una vez que se generan los callos o las células en suspensión, es conveniente obtener una línea celular, esto es un conjunto de células con características genéticas homogéneas, que produzcan de manera uniforme y constante los taxoides deseados, estas líneas pueden obtenerse de diferentes formas. La más sencilla consiste en observar y caracterizar los cultivos *in vitro* de callos o células en suspensión e ir clasificando los aspectos como color,

tamaño celular y tasa de crecimiento. Una vez seleccionados los cultivos pueden subcultivarse, continuando con la selección de las características iniciales observadas e ir eliminando las variaciones que se pudieran presentar (Zhao *et al.*, 2001).

El desarrollo de líneas celulares ha sido resultado principalmente de la manipulación de los componentes del medio de cultivo y el tipo de explantes. Por ejemplo, 1) la sustitución del ácido 2,4-diclorofenoxiacético por una auxina más débil como el ácido  $\alpha$ -naftalenacético o el ácido 3-indolacético (Chang *et al.*, 2006), 2) la sustitución de la citocinina cinetina por 6-bencilaminopurina (Zhao *et al.*, 2001), 3) la modificación en la relación auxina/citocinina (Hoekstra, 1993), 4) el aumento en la concentración de nitrato y 5) la modificación en la concentración de otros componentes del medio de cultivo como vitaminas o sacarosa (Zhao *et al.*, 2001).

### **2.9.5 Cultivo *in vitro* de callos de *Taxus* spp.**

Durante la última década, se han desarrollado protocolos básicos para la inducción y mantenimiento de callos para el cultivo de células de diferentes especies de tejo (Goleniowski, *et al.*, 2000). También se han investigado los factores que regulan la biosíntesis de taxol en cultivos *in vitro*, con el objeto de mejorar la producción de taxol y su liberación al medio de cultivo (Laskaris, 2000). Se han reportado productividades de hasta 23.4 mg L<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> tras la elicitación de un cultivo con metil jasmonato (Ketchum *et al.*, 1999) y porcentajes de taxol de 13-20% en referencia al total de taxanos. Tales cifras de producción demuestran la capacidad biosintética impresionante de los cultivos celulares de *Taxus*. En la actualidad la producción comercial de taxol con células vegetales ha sido escalada en biorreactores hasta de 75000 L (ESCAgenetic en CA, USA; Phyton en NY, USA; Samyang Gebex en Taejon, Korea; y Phyton Biotech en Alemania; Zhong, 2002).

### 2.9.6 Producción de taxoides en cultivos *in vitro* de callos de *Taxus* spp.

Existe una gran variabilidad en las respuestas de crecimiento así como en la producción de taxol en cultivos de callos derivados de genotipos diferentes (Brunakova *et al.*, 2004).

En las Cuadros 3 y 4 se concentran las principales investigaciones antes y después del año 2000.

Cuadro 3. Antecedentes del cultivo *in vitro* y cuantificación de taxoides en callos de *Taxus* spp. (Antes del año 2000).

Continente	Especie	Cuantificación	Referencia
Europeo	<i>T. baccata</i>	Taxol: 5.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s. Baccatina III: 4.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.	Cusido <i>et al.</i> , 1999
Americano	<i>T. brevifolia</i>	ND	-
Americano	<i>T. canadensis</i>	ND	-
Asiático	<i>T. chinensis</i>	Taxol en callo: 0.0026 % Taxol en células: 0.012 %	Fan <i>et al.</i> , 1996
Asiático	<i>T. wallichiana</i>	ND	-

ND: No determinado.

Cuadro 4. Antecedentes del cultivo *in vitro* y cuantificación de taxoides en callos de *Taxus* spp. (Después del año 2000).

Continente	Especie	Cuantificación	Referencia
Europeo	<i>T. baccata</i>	Taxol: 1.90-8.75 $\text{mg L}^{-1}$ Baccatina III: 4.55-18.90 $\text{mg L}^{-1}$	Correa <i>et al.</i> , 2006
Americano	<i>T. brevifolia</i>	ND	-
Americano	<i>T. canadensis</i>	ND	-
Americano	<i>T. globosa</i>	Taxol: 0.0028 $\text{mg g}^{-1}$ p.s.	Barrios <i>et al.</i> , 2009

ND: No determinado.

### **2.9.7 Fases del cultivo de células vegetales en suspensión**

Las células en suspensión incrementan su biomasa debido a la división celular, y éstas van a crecer hasta que se presente un factor limitante en el medio. Las células en el cultivo van a presentar cinco etapas en un ciclo de crecimiento (Jimenez, 2005):

1. Fase lag o de adaptación (las células se preparan para dividirse).
2. Fase exponencial (la velocidad de división celular es máxima).
3. Fase lineal (disminuye la velocidad de división celular pero se incrementa la velocidad de expansión celular).
4. Fase de desaceleración (disminuyen las velocidades de división y elongación celular).
5. Fase estacionaria (el número y tamaño de las células permanece constante) (Jiménez, 2005).

Para estudiar la cinética de crecimiento celular del cultivo en suspensión y determinar sus parámetros cinéticos se hace un seguimiento a través del tiempo del número de células, peso fresco de las células y peso seco. Otras características importantes que se estudian en un cultivo de células en suspensión son las referentes a los agregados, su tamaño, forma y distribución de tamaños (Jiménez, 2005).

### **2.9.8 Producción de taxoides en cultivos *in vitro* de células de *Taxus* spp.**

Los cultivos de células en suspensión generalmente muestran considerable variabilidad en su capacidad para producir metabolitos secundarios (Malik *et al.*, 2011) debido a la variación genética o a la heterogeneidad asociada con las células. El paso preliminar en el establecimiento de un cultivo celular a largo plazo se debe a la selección y clonación de

líneas celulares de rápido crecimiento capaces de producir taxol. En líneas celulares de *T. baccata* crecidas en las mismas condiciones muestran variaciones diferentes para producir taxol en cultivos en suspensión (Brunakova *et al.*, 2004).

El Cuadro 5 incluye información de la tasa de producción de taxol extracelular en cultivos de células en suspensión de *Taxus* spp. tanto en sistemas de matraces como en biorreactores; los cuadros 6 y 7 incluyen las investigaciones principales del cultivo *in vitro* en células antes del año 2000 y después del año 2000.

Cuadro 5. Tasa de producción de taxol extracelular en cultivos celulares de *Taxus* spp. (Modificado de Frense, 2007).

<b>Línea celular en matraces</b>	<b>Tasa de producción (mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referencia</b>
<i>T. baccata</i>	1.02	Khosroushahi <i>et al.</i> , 2006
<i>T. canadensis</i>	1.68	Kim <i>et al.</i> , 2006
<i>T. chinensis</i>	2.24	Kim <i>et al.</i> , 2001
<i>T. mairei</i>	4.76	Mulabagal y Tsay 2004
<i>T. cuspidata</i>	5.32	Nguyen <i>et al.</i> , 2001

Cuadro 6. Antecedentes del cultivo *in vitro* y cuantificación de taxoides en células de *T.* spp. (Antes del año 2000).

<b>Continente</b>	<b>Especie</b>	<b>Cuantificación</b>	<b>Autores</b>
Europeo	<i>T. baccata</i>	Taxol: 1.65 mg L <sup>-1</sup> 10 DAB III: 1.35 mg L <sup>-1</sup>	Jong <i>et al.</i> , 1998
Americano	<i>T. canadensis</i>	117 mg L <sup>-1</sup> (en 12 días)	Ketchum <i>et al.</i> , 1999
Americano	<i>T. canadensis</i>	3.0 mg L <sup>-1</sup> (en 35 días)	Phisalaphong <i>et al.</i> , 1999
Asiático	<i>T. cuspidata</i>	Taxol: 0.3-0.4 mg L <sup>-1</sup>	Seki <i>et al.</i> , 1997

Asiático	<i>T. wallichiana</i>	0.018% de taxol	Jha <i>et al.</i> , 1998
Asiático	<i>T. yunnanensis</i>	ND	ND

Cuadro 7. Antecedentes del cultivo *in vitro* y cuantificación de taxoides en células de *T.* spp. (Después del año 2000).

Continentes	Especie	Cuantificación	Autores
Europeo	<i>T. baccata</i>	Taxol: 7 mg L <sup>-1</sup> Baccatina III: 1.5 mg L <sup>-1</sup>	Cusido <i>et al.</i> , 2007
Americano	<i>T. brevifolia</i>	ND	-
Americano	<i>T. canadensis</i>	Taxol: Minuto cero: 2.0 mg L <sup>-1</sup> min 60: 6.1 mg L <sup>-1</sup>	Roberts <i>et al.</i> , 2003

## 2.10 Generalidades del cáncer

El cáncer no es una sola enfermedad, sino el nombre aplicado a una gran variedad de tumores malignos que se forman por crecimiento descontrolado de las células. Todos los órganos del cuerpo están formados de células. Normalmente las células se dividen para formar nuevas células sólo cuando el cuerpo lo necesita. Si las células se dividen cuando no se necesita su proliferación, se genera una masa denominada neoplasia o tumor. Los tumores pueden ser benignos (no cancerígenos) o malignos (cancerígenos). Las células de los tumores malignos pueden invadir y dañar órganos y tejidos vecinos. Algunas células cancerígenas pueden salir del tumor maligno y viajar por el torrente sanguíneo formando nuevos tumores en otras partes del cuerpo, a esto se le conoce como metástasis (American Cancer Society, 2013).

El crecimiento del tumor es autónomo, crecientemente maligno, y si no se trata, invariablemente mortal. El diagnóstico y tratamiento precoces son vitales, y la identificación

de personas con riesgo incrementado de cáncer antes del desarrollo de la enfermedad, constituye un objetivo importante de la investigación en esta área (Thompson *et al.*, 1996). En muchos casos, las causas del cáncer no son claras, ya que hay factores externos e internos implicados. Factores como el fumar, la dieta, mutaciones genéticas, exposición a rayos ultravioleta (UV) y exposición a químicos carcinogénicos pueden causar cáncer (American Cancer Society, 2013).

### **2.10.1 Tratamiento para el cáncer**

La cirugía es el tratamiento para cáncer más antiguo y aún el más común. La radioterapia, el uso de la radiación ionizante (rayos x), se usa para más de la mitad de los casos de cáncer. Como la cirugía, esta es un tratamiento local, pues afecta sólo el crecimiento y propagación de las células dentro del área del tratamiento. La quimioterapia es el uso de fármacos en el tratamiento. La quimioterapia es el uso de fármacos en el tratamiento del cáncer (American Cancer Society, 2013).

A diferencia de la cirugía y de la radioterapia, la quimioterapia es sistémica, es decir, actúa en todo el cuerpo. Un solo fármaco o la combinación de fármacos pueden ser usados. Existen otras opciones para el tratamiento del cáncer, sin embargo, las señaladas anteriormente son las más utilizadas actualmente. El miembro más importante de los agentes naturales utilizados para el tratamiento del cáncer es el paclitaxel (taxol<sup>®</sup>), (American Cancer Society, 2013).

### **2.10.2 Taxol y taxotere**

Dos nuevos medicamentos han sido introducidos recientemente en el ámbito oncológico y han dado un nuevo impulso al tratamiento de las neoplasias malignas. Antes que éstos ya existían otros medicamentos que actuaban a nivel del sistema microtúbulos-tubulina, como los alcaloides de la vinca, sólo que a diferencia de ellos, estos últimos compuestos se unen a

sitios específicos sobre la tubulina y previenen la polimerización de la misma dentro de los microtúbulos; los taxanos promueven el ensamblaje de la formación de microtúbulos y los estabilizan al prevenir la despolimerización; así, se forman microtúbulos estables no funcionales. Sin embargo, los dos medicamentos catalogados dentro de este grupo son básicamente el paclitaxel y el docetaxel, los cuales tienen sus diferencias en cuanto al mecanismo de acción, resistencia a la droga y naturaleza. El primero es de origen vegetal y el segundo es semisintético (Uriarte y Trejo, 2003).

### 2.10.3 Farmacocinética del taxol

El taxol es un éster alcaloideo derivado del tejo occidental *Taxus brevifolia*. Los taxanos se unen preferencialmente a los microtúbulos más que a los dímeros de tubulina, con una unión constante de aproximadamente un  $\mu\text{mol}$ ; más específicamente, el paclitaxel se une al N-terminal del aminoácido 31 de la subunidad beta de tubulina (Velasco *et al.*, 1993). El hígado es el principal órgano que metaboliza el paclitaxel y lo excreta en la bilis, tanto en forma de la droga natural como de sus metabolitos (Cuadro 8). Se elimina en 98% en las heces en seis días. Los metabolitos predominantes son productos de hidrolizado de la estructura química original, y el mayor de ellos es el 6- $\alpha$ -hidroxipaclitaxel (Velasco *et al.*, 1993).

Cuadro 8. Generalidades del paclitaxel.

Indicaciones principales	Mecanismo de acción	Interacciones	Efectos colaterales y precauciones	Contraindicaciones y advertencias
Cáncer de mama, pulmón, ovario, cabeza y cuello.	Agente que promueve la polimerización de la tubulina. Previene la despolimerización de los microtúbulos.	Con cisplatino aumenta la mielosupresión. Puede aumentar la vida media cuando se administra junto con	Mielosupresión*. Alopecia. Necrosis tisular por extravasación. Mucositis, náusea y vomito.	Ninguna.

(Velasco *et al.*, 1993). \*Mielosupresión: reducción en la capacidad de la médula ósea para producir células sanguíneas.

#### **2.10.4 Dosis del taxol**

Aunque las dosis también han variado según los diferentes autores que han usado el fármaco en distintos tipos de cáncer y con diferentes combinaciones de medicamentos, siempre han oscilado entre 135 mg/m<sup>2</sup> hasta 250 mg/m<sup>2</sup>, pero probablemente el estándar sea de 135 a 175 mg/m<sup>2</sup> cuando se usa combinado y un poco mayor cuando se emplea como monodroga (Velasco *et al.*, 1993). Tiene utilidad en tumores como cáncer de ovario; incluso, junto con el cisplatino o su derivado carboplatino se considera la mejor combinación en este padecimiento, otra indicación es en cáncer de mama, ya sea de primera línea o de rescate; en cáncer de pulmón al parecer también tiene un papel, pero hasta el momento no ha modificado sustancialmente los resultados que cuando se utilizan otras drogas como el otro taxano docetaxel o el alcaloide de la vinca, vinorelbine (Velasco *et al.*, 1993).

#### **2.10.5 Estadísticas del cáncer en México**

Las principales causas de muerte y enfermedades humanas se deben principalmente a la formación de procesos tumorales. Por ejemplo, en el año 2002 se estimó que había 10.9 millones de nuevos casos de cáncer, 6.7 millones de muertes, y 24.6 millones de personas viviendo con esta enfermedad alrededor del mundo (Jemal *et al.*, 2010).

Aunque el tratamiento más eficaz contra el cáncer sigue siendo la cirugía, la quimioterapia antineoplásica o citotóxica es imprescindible para el tratamiento de muchos pacientes. Los fármacos quimioterapéuticos actúan fundamentalmente inhibiendo el ciclo de división celular. El “Development Therapeutic Program del National Cancer Institute” los clasifica como: agentes alquilantes, antimetabólicos, inhibidores del enzima topoisomerasa I y II o

antimetabolitos de los ácidos nucleicos. El taxol (nombre comercial) o paclitaxel (nombre genérico) fue aprobado para el tratamiento de tumores sólidos como el cáncer de ovario y seno por la US Food and Drug Administration Office, el taxotere (nombre comercial) o docetaxel (nombre genérico) es también usado como fármaco anticáncer que ha demostrado actividad antitumoral clínica en pacientes con cáncer de pulmón, cabeza y cuello y en la leucemia (American Cancer Society, 2013).

El incremento del entendimiento de los procesos que toman lugar en las células tumorales así como en el avance de los estudios sobre las interrelaciones entre los fármacos anticáncer y los procesos tumorales, es respaldado por una abundante oferta de taxol y taxoides relacionados (American Cancer Society, 2013), esto puede constituir un gran paso adelante en la lucha contra los diversos tipos de cáncer (Figura 4).

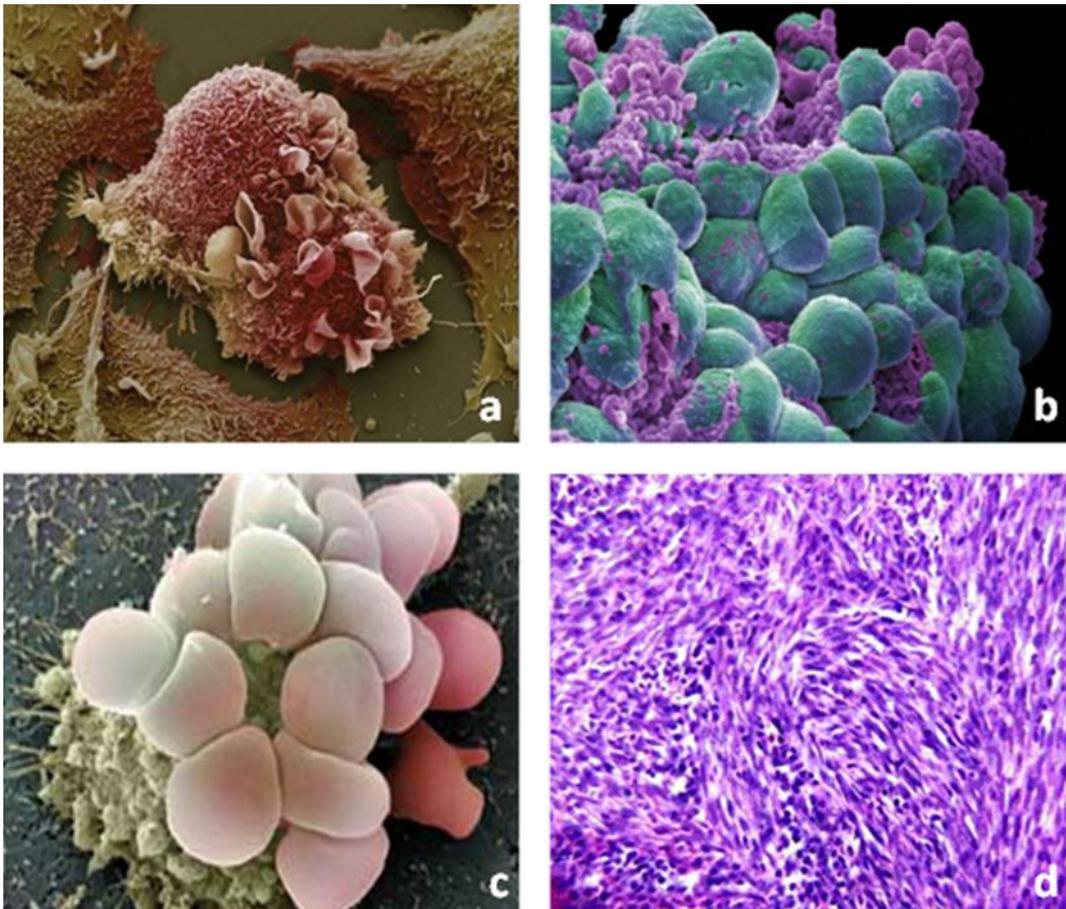


Figura 4. Uso médico actual del taxol en células cancerosas de: a) pulmón, b) seno, c) ovario, d) sarcoma de Kaposi de ganglio linfático. Fuente: National Geographic.

La mortalidad mundial del cáncer es superior a la del SIDA, la tuberculosis y el paludismo juntos. Se espera que el diagnóstico y tratamiento del conjunto de las más de 200 enfermedades que se engloban bajo el término cáncer experimentara una auténtica revolución a lo largo de la próxima década (American Cancer Society, 2013).

La Dirección general de información en salud de la Secretaría de Salud de México elaboró a partir de la base de datos de defunciones de 2008 INEGI/SS las principales causas de mortalidad general a nivel nacional (Cuadro 9), principales causas de mortalidad en mujeres (Cuadro 10) y de hombres (Cuadro 11).

Cuadro 9. Principales causas de mortalidad general en 2008 en México.

Orden	Descripción	Defunciones	%
	Total	538.288	100.00
1	Diabetes mellitus	75.572	11.1
2	Enfermedades isquémicas del corazón	59.579	10.4
3	Enfermedad cerebrovascular	30.212	7.0
4	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	28.422	4.6
5	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	20.565	3.9
6	Accidentes de vehículo de motor	16.882	3.7
7	Enfermedades hipertensivas	15.694	2.9
8	Infecciones respiratorias agudas bajas	15.096	2.6
9	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	14.767	2.6
10	Agresiones (homicidios)	13.900	2.1
11	Nefritis y nefrosis	12.592	1.8
12	Desnutrición calórica proteica	8.310	1.7
<b>13</b>	<b>Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón</b>	<b>6.697</b>	<b>1.5</b>
<b>14</b>	<b>Tumor maligno del estómago</b>	<b>5.509</b>	<b>1.1</b>
15	VIH/SIDA	5.183	1.1
<b>16</b>	<b>Tumor maligno de la próstata</b>	<b>5.148</b>	<b>0.9</b>
<b>17</b>	<b>Tumor maligno del hígado</b>	<b>5.037</b>	<b>0.8</b>
<b>18</b>	<b>Tumor maligno de la mama</b>	<b>4.840</b>	<b>0.8</b>
19	Lesiones autoinflingidas intencionalmente (homicidios)	4.668	0.8
<b>20</b>	<b>Tumor maligno del cuello del útero</b>	<b>4.031</b>	<b>0.8</b>
	Causas mal definidas	10.514	2.2
	Las demás	175.070	31.7

Los totales no incluyen defunciones de residentes en el extranjero

Secretaría de Salud/Dirección general de información en salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de Población de México 2005-2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

Cuadro 10. Principales causas de mortalidad en mujeres en 2008 en México.

Orden	Descripción	Defunciones	%
	Total	238.150	100.00
1	Diabetes mellitus	39.913	16.8
2	Enfermedades isquémicas del corazón	25.943	10.9
3	Enfermedad cerebrovascular	15.840	6.7
4	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	8.988	3.8
5	Enfermedades hipertensivas	8.898	3.7
6	Infecciones respiratorias agudas bajas	7.020	2.9
7	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	6.969	2.9
8	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	6.285	2.6
9	Nefritis y nefrosis	5.810	2.4
<b>10</b>	<b>Tumor maligno de la mama</b>	<b>4.818</b>	<b>2.0</b>
11	Desnutrición calórica proteica	4.238	1.8
<b>12</b>	<b>Tumor maligno del cuello del útero</b>	<b>4.031</b>	<b>1.7</b>
13	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	3.531	1.5
<b>14</b>	<b>Tumor maligno del hígado</b>	<b>2.718</b>	<b>1.1</b>
<b>15</b>	<b>Tumor maligno del estómago</b>	<b>2.554</b>	<b>1.1</b>
<b>16</b>	<b>Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón</b>	<b>2.255</b>	<b>0.9</b>
<b>17</b>	<b>Tumor maligno del colon y recto</b>	<b>1.953</b>	<b>0.8</b>
18	Anemia	1.926	0.8
<b>19</b>	<b>Tumor maligno del páncreas</b>	<b>1.895</b>	<b>0.8</b>
20	Enfermedades infecciones intestinales	1.835	0.8
	Causas mal definidas	5.179	2.2
	Las demás	75.551	31.7

No se incluyen defunciones de residentes en el extranjero

Secretaría de Salud/Dirección general de información en salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de Población de México 2005-2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

Cuadro 11. Principales causas de mortalidad en hombres en 2008 en México.

Orden	Descripción	Defunciones	%
	Total	299.968	100.00
1	Diabetes mellitus	33.265	11.1
2	Enfermedades isquémicas del corazón	31.318	10.4
3	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado.	20.922	7.0
4	Enfermedad cerebrovascular	13.894	4.6
5	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	11.830	3.9
6	Agresiones (homicidios)	11.119	3.7
7	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	8.606	2.9
8	Ciertas afecciones originadas en el periodo	7.808	2.6

	perinatal		
9	Infecciones respiratorias agudas bajas	7.727	2.6
10	Enfermedades hipertensivas	6.353	2.1
11	Nefritis y nefrosis	6.223	1.8
<b>12</b>	<b>Tumor maligno de la próstata</b>	<b>4.959</b>	<b>1.7</b>
<b>13</b>	<b>Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón</b>	<b>4.414</b>	<b>1.5</b>
14	VIH/SIDA	4.199	1.1
15	Desnutrición calórica proteica	4.165	1.1
16	Lesiones autoinflingidas intencionalmente (suicidios)	3.614	0.9
<b>17</b>	<b>Tumor maligno del estómago</b>	<b>2.857</b>	<b>0.8</b>
18	Uso de alcohol	2.726	0.8
<b>19</b>	<b>Tumor maligno del hígado</b>	<b>2.248</b>	<b>0.8</b>
20	Ahogamiento y sumersión accidentales	2.150	0.8
	Causas mal definidas	5.310	2.2
	Las demás	104.261	31.7

No se incluyen defunciones de residentes en el extranjero

Secretaria de Salud/Dirección general de información en salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de Población de México 2005-2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

## 2.11 Antecedentes históricos del taxol

El paclitaxel, también conocido como taxol<sup>®</sup>, se descubrió dentro de un extenso proyecto del “National Cancer Institute” (USA) iniciado en 1960 bajo la dirección del Dr. Jonathan L. Hertwell, en el que se analizaron los componentes antitumorales de cientos de extractos de origen vegetal (Cragg, 1998; Ramesh, 1998).

El taxol se aisló por primera vez en 1967 a partir de la corteza de *Taxus brevifolia*. Sin embargo, fue en 1971 cuando se reportó su estructura, elucidada mediante una combinación de técnicas de RMN y de cristalografía de rayos X, y la actividad citotóxica *in vitro* del compuesto frente a una variedad de tumores (Wani *et al.*, 1971).

Es importante definir los acontecimientos importantes en el descubrimiento del taxol, desde el aislamiento de un compuesto químico denominado taxina en 1856, hasta las prioridades de obtener una mayor cantidad del producto para los pacientes con cáncer (Cuadro 12).

Cuadro 12. Pasos principales del descubrimiento y el desarrollo del taxol como un fármaco anticáncer.

Año	Evento	Referencia
1856	Aislamiento de la taxina de <i>T. baccata</i>	Lucas, 1856
1956	La taxina es una compleja mezcla de alcaloides	Lucas, 1856
1964	El extracto de <i>T. brevifolia</i> es tóxico para células de leucemia de murino.	Song y Dumais, 1991
1969	El paclitaxel es obtenido en forma pura	Song y Dumais, 1991
1971	Elucidación estructural del taxol. El taxol se encuentra en bajas concentraciones en la planta y se relaciona con una estructura de diterpeno compleja e insoluble en agua.	Wani <i>et al.</i> , 1971
1979	Descubrimiento del mecanismo de acción (interacción con el complejo de tubulina/microtúbulo)	Schiff <i>et al.</i> , 1979
1983	Ensayos clínicos	Cragg <i>et al.</i> , 1993
1989	Publicación de los resultados de los ensayos clínicos	McGuire <i>et al.</i> , 1989, Colmes <i>et al.</i> , 1991
Actualidad:	La prioridad es generar programas de investigación que puedan resolver el problema de la disponibilidad del producto.	

La fórmula molecular del taxol es  $C_{47}H_{51}NO_{14}$  y su peso molecular es de  $853.9 \text{ g mol}^{-1}$  (Malik *et al.*, 2011). En 1999, las ventas a nivel mundial de taxol, producido por Bristol-Myers Squibb (BMS) alcanzaron \$1.5 billones de dólares. Aunque esta compañía reportó una disminución del 24% de ventas de taxol, de 422 millones de dólares en 2006 a \$385 millones en 2007 (Malik *et al.*, 2011), esta reducción se debe primariamente a que la patente expiró y se originó un incremento de competición de genéricos en Europa así como la entrada de genéricos en Japón durante el tercer trimestre de 2006 (Malik *et al.*, 2011).

### 2.11.1 Características químicas del taxol

La estructura del taxol ( $C_{46}H_{49}O_{14}N$ ) se muestra en la Figura 5. El taxol ( $C_{46}H_{49}O_{14}N$ ) (Figura 5) es un diterpeno complejo con un núcleo taxánico de 20 carbonos derivado del geranilgeranilpirofosfato. Aunque el taxol muestra algunas similitudes estructurales con otros alcaloides naturales su núcleo taxánico es único (Barrales y Soto, 2011). El taxol difiere de los otros taxanos en dos aspectos: 1) posee un núcleo taxánico esterificado en la posición del C-13 con una cadena lateral de fenilisoserina en el C13 de su molécula, la que es altamente flexible, y puede adquirir conformaciones alternativas dependiendo del medio (Figura 6).

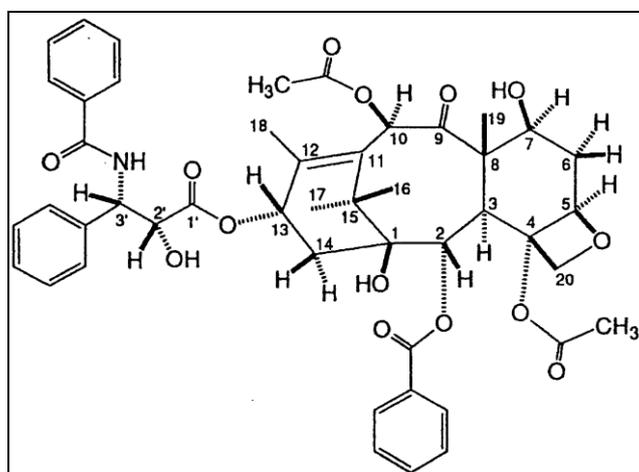


Figura 5. Estructura química del taxol. (ChemDraw, 2011).

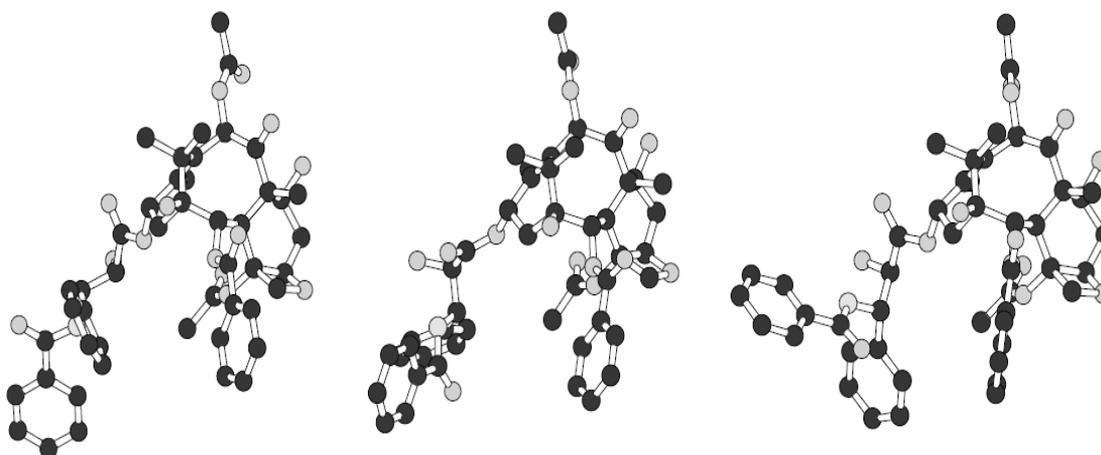


Figura 6. Conformación polar (izquierda), conformación apolar (centro), y conformación en forma de T (derecha) de la molécula del taxol (Lakdawala et al., 2001).

2) tiene un cuarto anillo en forma de anillo de “oxetano” que une los C de las posiciones 4 y 5. Estas dos cualidades son necesarias para su actividad biológica. El núcleo taxánico consiste en cuatro anillos, el A (sistemas de 6 carbonos), el B (sistema de 8 carbonos), el C (sistemas de 6 carbonos) y el D (anillo de oxetano) (Figura 7), (Barrales y Soto, 2011).

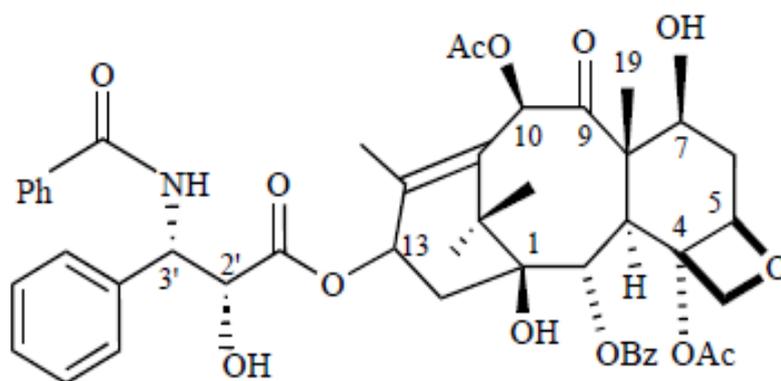


Figura 7. Estructura química de la molécula del taxol (paclitaxel).  $C_{47}H_{51}NO_{14}$  P.M.: 853.90 (Expositó *et al.*, 2009).

La cefalomanina se conoce también con el nombre de taxol B, es un análogo del taxol y también se encuentra en los extractos del árbol del tejo (Mroczek *et al.*, 2000). La cefalomanina difiere del taxol sólo en la porción de la amida; el sustituyente en la posición C3' es tigloilamida en lugar de benzamida. Debido a la similitud estructural, la cefalomanina muestra actividad antitumoral comparable con el taxol hacia varias líneas celulares diferentes (Shi *et al.*, 2001). Éste es especialmente efectivo contra la leucemia y ciertas células tumorales neuronales (Helson and Ainsworth, 1997). A pesar de su promisoría actividad antitumoral, se sabe relativamente poco acerca del metabolismo de la cefalomanina (Mroczek *et al.*, 2000).

El paclitaxel tiene una estructura química muy compleja en la que destaca un esqueleto hidrocarbonado formado por tres ciclos de 6, 8 y 6 carbonos polisustituido con 4 metilos y ocho funciones oxigenadas (entre ellas, una de  $\beta$ -fenilisoerina que esterifica la posición C-13). La molécula posee un total de 11 estereocentros. El taxol comercialmente disponible es un polvo blanco, incoloro, amorfo, higroscópico con una pureza de 98% (por HPLC) con un peso molecular de 853.9. El taxol es prácticamente insoluble en agua y tiene un máximo de absorción UV a 227 nm. La determinación de su estructura en 1971 a partir del análisis mediante difracción por rayos X fue todo un reto para los científicos de la época; así como lo fue también posteriormente su síntesis total publicada en 1994 (Centelles e Imperial, 2010).

### **2.11.2 Fuentes de taxol**

Originalmente el taxol fue aislado de la corteza de *Taxus brevifolia* (tejo del pacífico). *Taxus brevifolia* es un árbol, de 6 a 12 m de altura, 30 a 40 cm de diámetro y vida de 250 a 350 años. La corteza es delgada (mide cerca de 3 mm), así, de un árbol de 100 años se pueden obtener en promedio 3 kg de corteza, de la que es posible aislar 300 a 450 mg de taxol. El descortezamiento mata a la planta (Appendino, 1993). Debido a que el tratamiento de un solo paciente con cáncer requiere al menos 3 g de taxol (Rohr, 1997), se han buscado nuevas alternativas para la producción, ya que de otro modo la gran demanda del fármaco acabaría con la especie en poco tiempo.

### **2.11.3 Actividad biológica del taxol**

El mecanismo de acción fue estudiado por Schiff *et al.* (1979), descubriendo un mecanismo único entre los componentes antitumorales conocidos hasta entonces. Esto ocasionó un mayor interés por el compuesto y se iniciaron estudios preclínicos en animales que confirmaron la actividad del taxol contra una gran variedad de tumores. El taxol entró en ensayos clínicos de

la fase I en 1984, y ensayos de la fase II en 1985. Estos ensayos fueron limitados por el suministro del medicamento, sin embargo, se mostró la primera evidencia clara de actividad con respuestas clínicamente relevantes en el cáncer ovárico (McGuire, 1989) y en el cáncer de mama (Holmes, 1991). Después de ser aprobado para el tratamiento de cáncer de ovario por la FDA de Estados Unidos en diciembre de 1992, ha sido aprobado en varios países para el tratamiento de cánceres de pecho, cervical, endometrio, pulmón, vejiga, cabeza, cuello, sarcoma de Kaposi y leucemia (Skeel, 1999; Arbuck, 1995). El NCI (National Cancer Institute) seleccionó a la compañía farmacéutica Bristol-Myers Squibb para el desarrollo, producción y distribución del medicamento.

El paclitaxel, debido a su actividad biológica, se clasifica dentro del grupo de los denominados fármacos antimitóticos. Los microtúbulos poseen dos extremos. En uno de ellos, identificado con un signo matemático (-), es donde se inicia la nucleación y en el otro (+) el microtúbulo va creciendo. Una vez iniciado el crecimiento del microtúbulo, éste adopta un aspecto cilíndrico, de unos 25 nm de diámetro, con 13 protofilamentos que forman el círculo del microtúbulo. Los microtúbulos son estructuras dinámicas, lo que significa que se pueden alargar añadiéndose más heterodímeros (tubulina-GTP) en el extremo (+); pero también pueden acortarse (si el GTP se hidroliza) y liberarse heterodímeros (tubulina-GTP) en el extremo (+); pero también pueden acortarse (si el GTP se hidroliza) y liberarse heterodímeros (tubulina-GDP) del extremo (-). Durante la interfase, los microtúbulos forman una red desde el centro por todo el citoplasma, pero al comenzar la mitosis, los microtúbulos se disgregan para poder formar el huso mitótico (Centelles e Imperial, 2010).

Los microfilamentos se encuentran en un estado poco habitual de rápido ensamblaje y desensamblaje, lo cual explica la extrema sensibilidad del huso a distintos compuestos que se unen a la tubulina. Los fármacos anticancerígenos responsables de afectar la dinámica de los

microtúbulos o de unirse a tubulina son los denominados fármacos antimitóticos, pues alteran el buen funcionamiento del huso mitótico. Entre estos antimitóticos destacan los fármacos responsables de inhibir el ensamblaje del microtúbulo (familias de la colchicina y la vinblastina) y los responsables de promover la unión y estabilizar el microtúbulo (familia del paclitaxel). El modo de acción del paclitaxel evita la formación del huso mitótico, pero en este caso provocando la formación de un polímero demasiado largo (Figura 8). El paclitaxel se une a la  $\beta$ -tubulina, y con ello favorece la formación de largos polímeros, incluso en presencia de GDP, que no podrán acortarse (Centelles e Imperial).

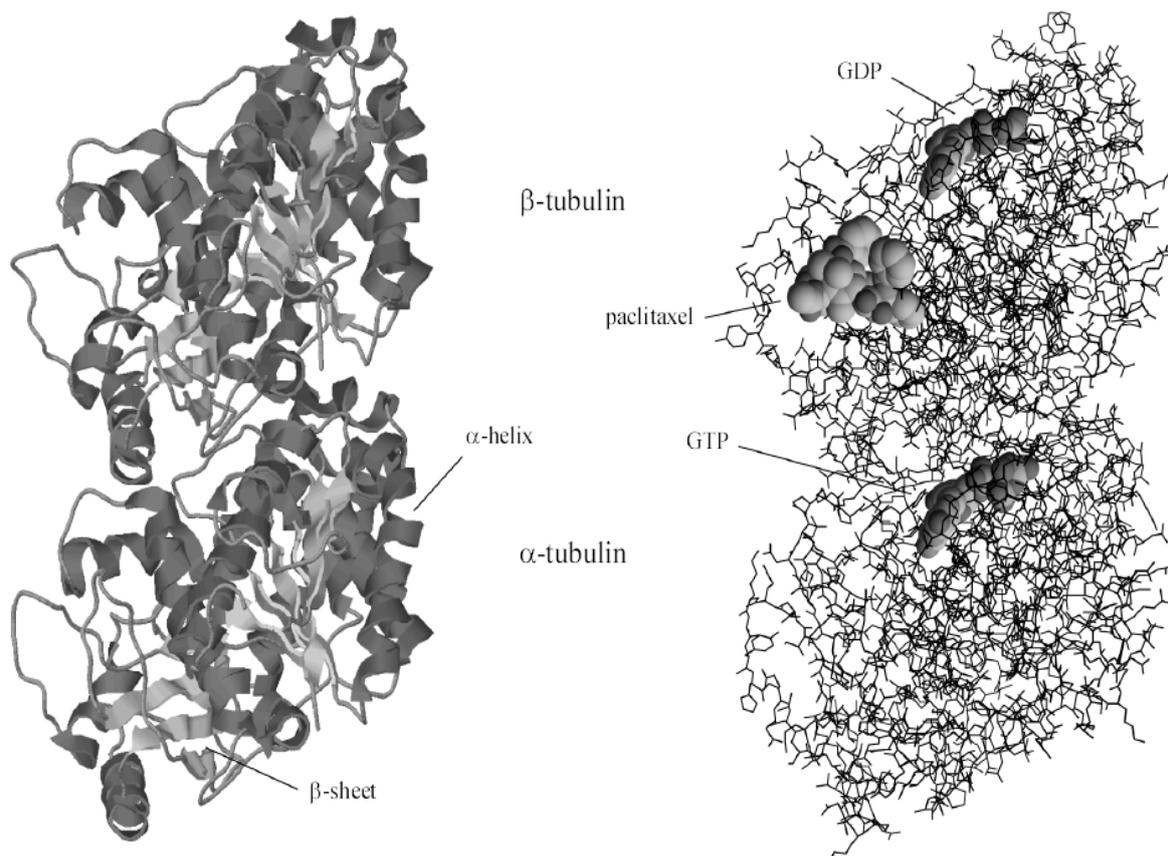


Figura 8. Imagen de la estructura del heterodímero de tubulina de protofilamentos de cerebro bovino (izquierda) determinado por cristalografía de electrones y un modelo metálico (derecha) muestra el paclitaxel y el GDP unido a  $\beta$ -tubulina, y GTP unido a  $\alpha$ -tubulina se utilizaron en este modelo. Fuente: Las coordenadas se obtuvieron del banco de datos de proteínas Brookhaven (PDB código de identificación: 1JFF).

El microtúbulo estabilizado con paclitaxel posee 12 protofilamentos (en lugar de los 13 protofilamentos normales) y un diámetro inferior al normal (de 22 nm). La estabilización de los microtúbulos provoca la pérdida de función del huso, la consiguiente parada del ciclo celular en la transición metafase/anafase y, finalmente, la muerte celular (Sparano *et al.*, 2008) (Figura 9).

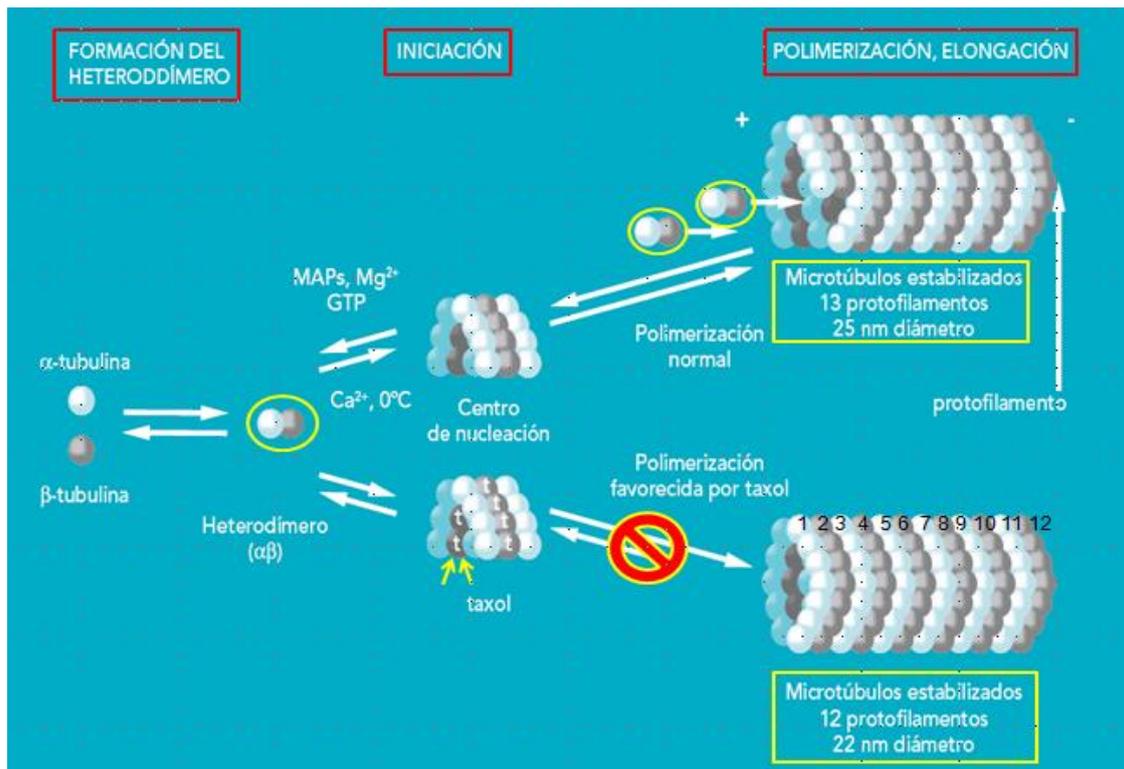


Figura 9. Mecanismo de polimerización de los microtúbulos. En la parte inferior del esquema se observa la modificación de los microtúbulos en presencia del taxol. (Centelles e Imperial, 2010).

#### 2.11.4 Biosíntesis de los taxoides

Muchos avances se han hecho en referencia a la identificación de los genes responsables de la biosíntesis del paclitaxel, siendo un proceso que requiere conocer principalmente las reacciones enzimáticas que involucran la construcción del esqueleto tetracíclico y la adición de varios oxígenos y grupos funcionales acilo. Existe una gran variación en el contenido de

taxoides, debiéndose principalmente a las diferentes especies y cultivares. El paclitaxel es un compuesto de naturaleza isoprenoide. Los isoprenoides constituyen una familia compleja de compuestos (más de 35000 identificados hasta el momento) que presentan una gran variedad de estructuras y funciones). No obstante, a pesar de su gran diversidad, todos los isoprenoides derivan de dos precursores estructurales comunes de cinco átomos de carbono, el isopentenil difosfato y su isómero, el dimetilalildifosfato (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

El esqueleto central de la molécula de paclitaxel es un anillo de taxano de naturaleza isoprenoide y deriva del geranylgeranyl difosfato (GGPP), el precursor común de los isoprenoides de 20 átomos de carbono (diterpenos), entre los que se encuentran compuestos tales como los carotenoides, la cadena de fitol de las clorofilas o las giberelinas, que participan en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo, todos ellos se forman a partir de los mismos precursores, isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP) (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En muchos organismos vegetales existe una dicotomía respecto a la biosíntesis de los precursores de los terpenoides. En el citosol, la clásica ruta del mevalonato produce IPP de acetil coenzima A para la biosíntesis de los esteroides, triterpenos y ciertos sesquiterpenos. Los plastidios son el sitio de la ruta alternativa del no-mevalonato que produce IPP y DMAPP de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato comenzando con los isoprenoides plásticos: monoterpenos, diterpenos (derivados de cuatro moléculas de isopreno) y tetraterpenos (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Los taxoides constituyen un grupo de compuestos diterpénicos caracterizados por la presencia de un esqueleto de taxano (Figura 10). El anillo de oxetano es principalmente encontrado en las especies de *Taxus* spp. La formación del anillo de oxetano en la biosíntesis

del taxol involucra 2 enzimas: A) CitP450 C4-C20 epoxidasa y B) isomerasa (oxomutasa) (Figura 11), (Expositó *et al.*, 2009).

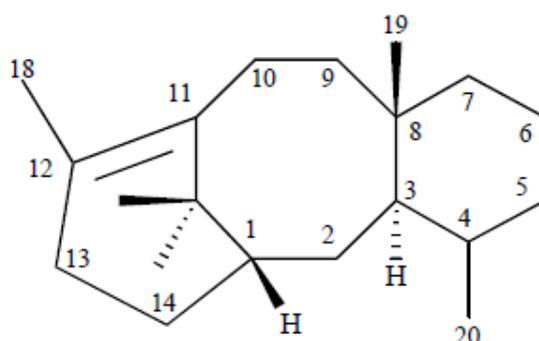


Figura 10. Estructura química del anillo de taxano (Expositó *et al.*, 2009).

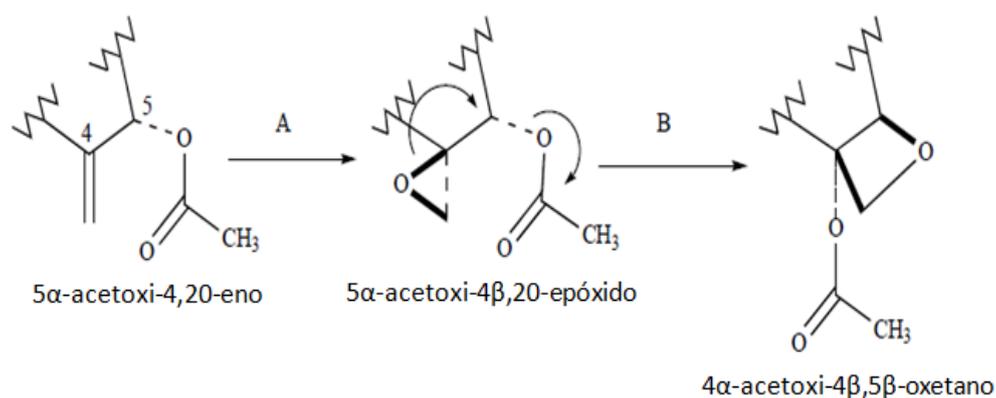


Figura 11. Formación del anillo de oxetano en la biosíntesis del taxol (Expositó *et al.*, 2009).

Hasta el presente, la estructura química de más de cien taxoides es conocida, se empezaron a clasificar de acuerdo a la oxigenación del C<sub>20</sub> y a la presencia o no de cadenas laterales. Los taxoides más importantes sin la cadena lateral C<sub>13</sub> son baccatina III y sus compuestos derivados, mientras que los principales taxoides con la cadena lateral C<sub>13</sub> son el taxol, cefalomanina y sus compuestos relacionados (Figura 12), (Expositó *et al.*, 2009).

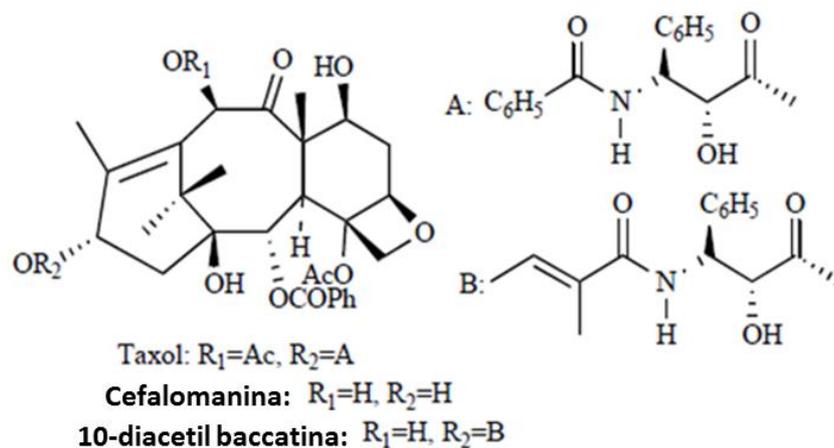


Figura 12. Estructura general de los taxoides investigados en este trabajo, paclitaxel es el nombre genérico del taxol, el cual ha sido registrado como una marca de Bristol-Myers Squibb. Ac, grupo acetilo, Ph, grupo fenilo (Expositó *et al.*, 2009).

El primer paso en la biosíntesis de taxol es la ciclización de geranylgeranyl difosfato (GGPP), el cual comienza con la formación de taxa-(4,5), (11,12)-dieno, el primer compuesto en la ruta biosintética del taxol que presenta el esqueleto de taxoide (Figura 13), (Expositó *et al.*, 2009).

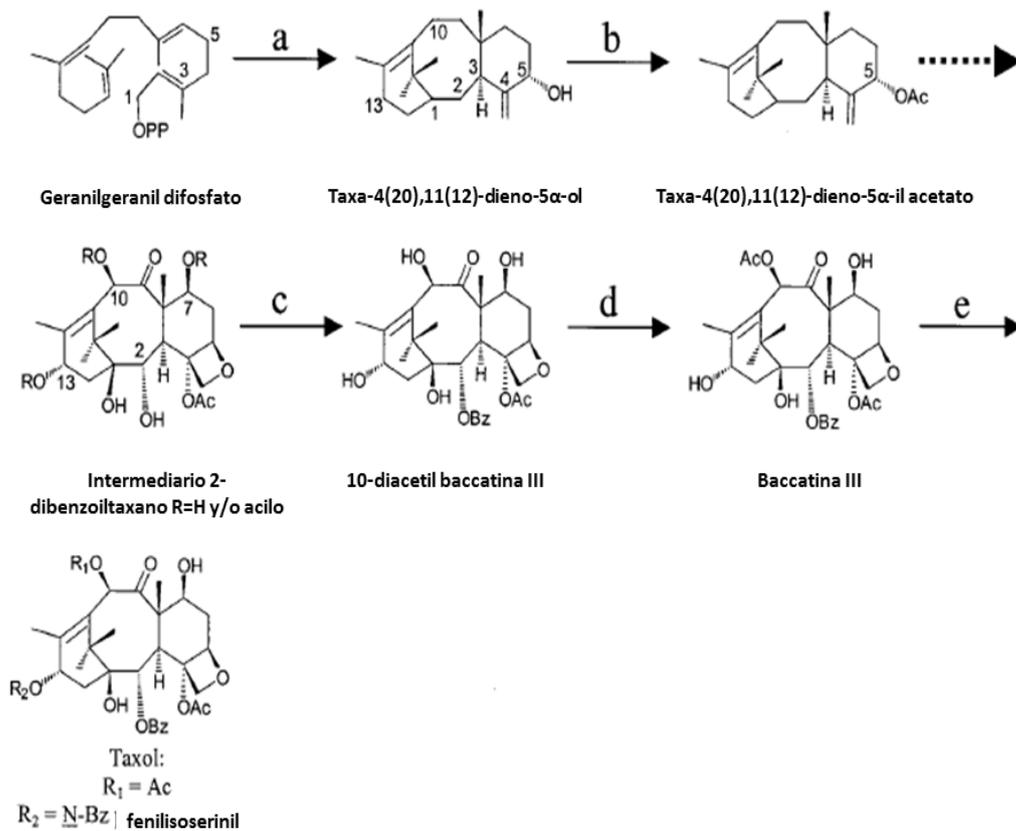


Figura 13. Esquema de la ruta de biosíntesis de los taxoides en *Taxus* spp. La ciclización de geranylgeranyl difosfato a taxadieno por la enzima taxadieno sintasa y la hidroxilación a taxadien-5 $\alpha$ -ol por la enzima taxadieno 5 $\alpha$ -hidroxilasa (a), la acetilación de taxadien-5 $\alpha$ -ol por la enzima taxa-4(20), 11 (12)-dien-5 $\alpha$ -ol O-acetiltransferasa (TAT) (b), la conversión de 2-debenzoil "tipo-taxoide" intermediario a 10-deacetyl baccatina III por una enzima taxano 2 $\alpha$ -O-benzoyltransferasa (TBT) (c), la conversión de 10-deacetilbaccatina III a baccatina III por la enzima 10-deacetilbaccatina III 10-O-acetiltransferasa (DBAT) (d), y el accesorio de la cadena lateral para baccatina III para formar taxol (e). La flecha discontinua indica que están por definirse estos pasos (Modificado de Heinig y Jennewein, 2009).

Esta reacción es catalizada por la enzima taxadieno sintasa (TS), una enzima formada por una proteína monomérica de 79 kDa con propiedades similares a otras ciclasas de terpenoides. La enzima fue purificada y caracterizada por Hezari, Lewis y Croteau y los genes que codifican para la TS fueron identificados y clonados por Wildung y Croteau. El producto de la reacción es la hidroxilación de la posición del C5 por la enzima Cit P450 taxadieno-5 $\alpha$ -hidroxilasa (T5 $\alpha$ H) para formar taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol. Esta enzima, aparte de su actividad de

hidroxilación, tiene condiciones de migración del doble enlace de 4(5) a 4(20). Estos dos pasos metabólicos, ciclización e hidroxilación, son bajos, pero ellos no se observan, por ser limitantes en la velocidad en la biosíntesis del taxol (Expositó *et al.*, 2009).

El próximo paso en la ruta de biosíntesis que comienza a formar el taxol es catalizado por una enzima específica: taxadieno-5 $\alpha$ -ol-O-acetil transferasa (TDAT) que acila taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol a la posición del C5 para formar taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -yl-acetato (Walker *et al.* 2000). Este taxoide es entonces hidroxilado por una P450-dependiente monooxigenasa, encontrada en *T. cuspidata* (árbol de tejo japonés), la cual cataliza la hidroxilación a la posición C10 para producir taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ , 10 $\beta$ -diol 5-acetato. La enzima que controla este paso, la taxoide 10 $\beta$ -hidroxilasa (T10 $\beta$ H) fue clonada y funcionalmente caracterizada en levaduras (Maheshwari *et al.*, 2008).

En el 2001, otra Cit P450-dependiente hidroxilasa fue encontrada, usando taxa-4(20),11(29)-dien-5 $\alpha$ -ol como un substrato, comenzando con la formación de taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -13 $\alpha$ -diol. Esta enzima, la taxol 13 $\alpha$ -hidroxilasa (T13 $\alpha$ H), presenta 63% de identidad y 67% similitud con la hidroxilasa responsable para la hidroxilación en la posición C10. Al mismo tiempo, el hecho de que esta enzima use el mismo substrato como TDAD, la taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol, sugiere que la biosíntesis del taxol no es una ruta lineal y que algunas ramas de la ruta pueden dar comienzo a otros taxoides relacionados (Expositó *et al.*, 2009).

Se ha observado como este paso alternativo fue especialmente frecuente en cultivos de células elicidadas con jasmonato de metilo (Eisenreich *et al.*, 1996). Otra Cit P450-dependiente de hidroxilasa (taxoide 14 $\beta$ -hidroxilasa; T14 $\beta$ H) responsable para la producción de taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -acetoxi-10 $\beta$ -14 $\beta$ -diol fue encontrada después (Cusidó *et al.*, 2002). Esta enzima utiliza substratos hidroxilando a la posición del C10, pero no los hidroxila

a la posición C13, sugiriendo que esta enzima podría estar involucrada en la producción del taxol desde este compuesto sin presentar alguna hidroxilación a la posición C14 (Expositó *et al.*, 2009).

Después de la formación de taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ ,10 $\beta$ -diol 5-acetato, se originan hidroxilaciones en las posiciones de C1, C2, C4 y C7, oxidación de C9 y epoxidación en el doble enlace C4C5 tomando lugar en la ruta biosintética del taxol. El orden de las hidroxilaciones mediadas por enzimas Cit P450 no es completamente conocida, pero sobre la base de la frecuencia de la oxidación de los taxoides se ha encontrado en cultivo de células, una secuencia probable podría ser: C5, C10, C2, C9, C13 y finalmente C1 (Expositó *et al.*, 2009).

Se podría tomar en cuenta que algunos de los taxoides considerados podrían no participar en la formación del taxol o podrían ser artefactos de los cultivos *in vitro*, pero esta secuencia de oxidación se ha validado por análisis filogenéticos de enzimas taxoide oxigenasas P450 clonadas previamente. Sin embargo, la formación del anillo de oxetano es también muy importante, esto es esencial para la actividad anti-cáncer de la molécula del taxol. Diferentes mecanismos para su formación fueron propuestos, en la actualidad se acepta que tal proceso involucra la epoxidación del puente doble 4(20) seguido por una migración del grupo  $\alpha$ -acetoxi del C5 a la posición C4 junto con la expansión del oxirano al grupo oxetano. Es posible que la formación de oxirano/oxetano preceda a la hidroxilación del C1 en la biosíntesis del taxol, y en este caso el intermediario polihidroxiado hipotético podría ser más bien un taxadien-hexaol que un heptaol hidroxilado a C1 (Walker *et al.*, 2002).

La enzima que epoxida el doble enlace C4-C20 aún no se ha caracterizado funcionalmente y la expansión del anillo de oxirano-oxetano es también un paso incompletamente conocido. Después de la formación del precursor polihidroxiado hipotético por la actividad de la

enzima 2 $\alpha$ -O-benzoyl transferasa (DBT), el próximo compuesto obtenido es 10-deacetyl baccatina III. La enzima 10-diacetil-baccatinaIII-10-O-acetil transferasa (DBAT) entonces acila el grupo hidroxilo a la posición C10 para formar baccatina III (Figura 14), (Expositó *et al.*, 2009).

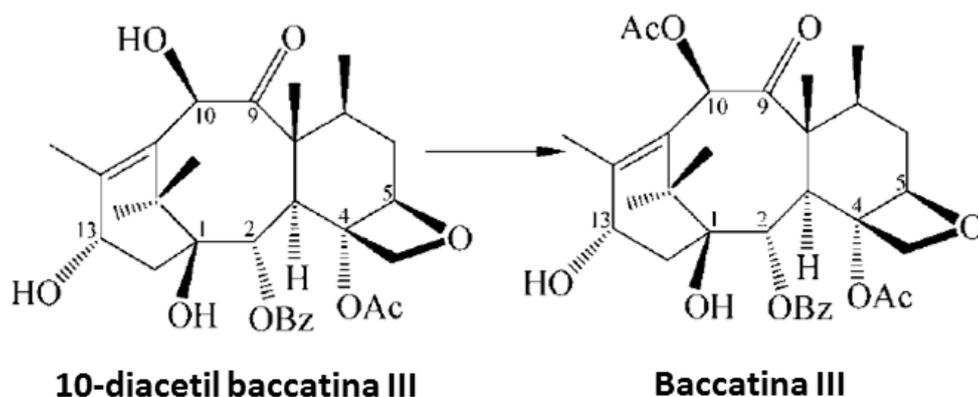


Figura 14. Conversión de 10-DAB III a baccatin III por la enzima 10-DAB acetil transferasa (Modificado de Heinig y Jennewein, 2009).

Un paso esencial en la biosíntesis del taxol es la esterificación del C13 del grupo hidroxilo de la baccatina III con la  $\beta$ -fenilalanoil-CoA cadena lateral. La cadena lateral es obtenida del aminoácido  $\alpha$ -fenilalanina por la acción de la fenilalanina aminomutasa (PAM) (Palazón *et al.*, 2003),

La cadena lateral C-13(2'R,S),-N-benzoil-3' fenilisoserina es esencial para la citotoxicidad, por lo que en relación con la cadena lateral se considera que la modificación o eliminación del 2'OH disminuye la actividad (Figura 15), (Expositó *et al.*, 2009).

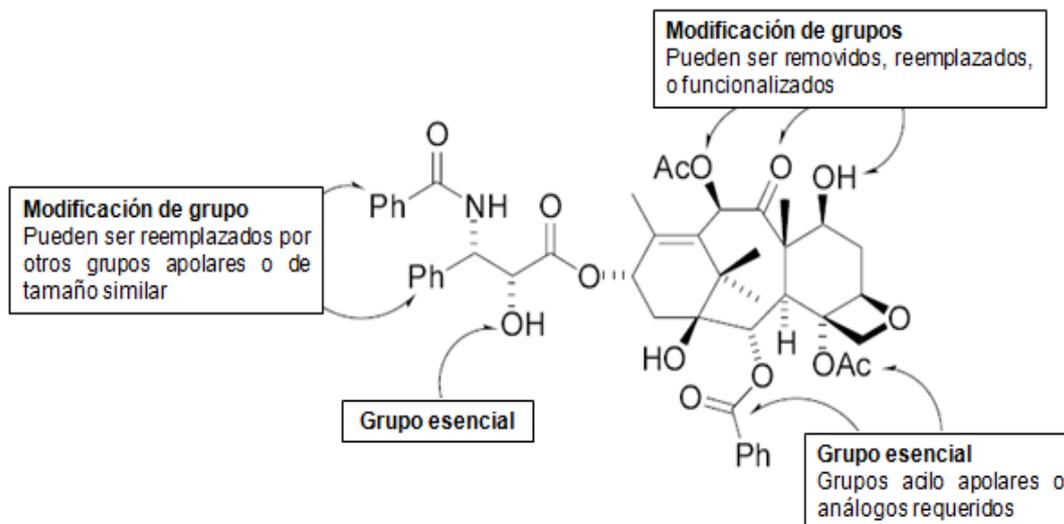


Figura 15. Modificaciones que pueden ocurrir en los grupos contenidos en la molécula de taxol (Expositó *et al.*, 2009).

En el metabolismo del taxol, la regulación del flujo del carbono parece ser importante, porque la fuente de carbono es usada tanto en el metabolismo primario como en el secundario. Se conoce que los carbohidratos entran a la planta vía celular por una de las tres siguientes rutas: (a) a través de los canales plasmodesmata, (b) a través de la membrana como sucrosa y (c) a través de la membrana como hexosas. Cada ruta tiene el potencial de transmitir diferentes señales a un mecanismo de detección de carbohidratos. También se ha reportado que los grupos acetatos son buenos precursores para la síntesis del grupo acetilo de la molécula de taxol, y que la fenilalanina es un precursor para la síntesis de la cadena lateral de la molécula de taxol (Expositó *et al.*, 2009).

### 2.11.5 Síntesis del taxol

Las preocupaciones ambientales asociadas a la recolección de tejos, aunada con el aumento de demanda del anticancerígeno, han ocasionado considerables esfuerzos para desarrollar una fuente más sustentable de taxol. La síntesis total de taxol se reportó en 1994 por dos grupos

de investigación distintos (Holton *et al.*, 1994). Sus reportes indican que la síntesis química total de taxol había sido alcanzada con un rendimiento de producción de 2.7% y 0.07%, respectivamente. Dos años después, se ideó la tercera ruta que requirió menos pasos que las rutas anteriores (Danishefsky *et al.*, 1996). El éxito de este método se divulgó más tarde (Morihiro *et al.*, 1998), sin embargo, aunque la síntesis total sea un gran logro científico, no es una estrategia viable comercialmente, al menos en el futuro próximo. En todos los casos, se trata de métodos complejos y costosos, que requieren más de 20 pasos de reacción con rendimientos globales muy bajos (Nicolaou *et al.*, 1994).

#### **2.11.6 Semisíntesis orgánica de los taxoides**

La síntesis química del taxol no ha tenido éxito y la síntesis parcial requiere a baccatina III como el material de partida, que por mucho debe ser extraído del material vegetal y que también se encuentra en niveles bajos en los tejidos vegetales. Tanto el taxol como su análogo el docetaxel, se producen semi-sintéticamente a través de la acilación de 10-diacetilbaccatina III aislado de las agujas (hojas) de diferentes especies de *Taxus*, pero conlleva a efectos secundarios no deseados en los pacientes (Holton *et al.*, 1995).

Los extractos del follaje de los tejos contienen una mezcla compleja de taxanos, el taxol está presente en una proporción muy baja en relación con los taxanos totales (Gueritte-Voegelein, 1986). El componente más abundante en esta mezcla de taxanos es 10-diacetilbaccatina III que se obtiene con rendimientos de 0.1% en base a peso seco (Denis *et al.*, 1988). La semisíntesis de taxol consiste en el aislamiento de 10-diacetilbaccatina III extraída del follaje de diferentes especies de tejo, para posteriormente convertirse en taxol mediante el acoplamiento de la cadena lateral N-benzoil-3-fenylisoserina al grupo hidroxilo del carbono C-13 y la acetilación en el C-10 previamente sintetizadas (Holton *et al.*, 1995).

También se ha reportado la conversión enzimática de una mezcla de taxanos a 10-DABIII. Las enzimas utilizadas son la C-13 taxolasa (que cataliza el corte de la cadena lateral del C-13 de varios taxanos), la C-10 deacetilasa (que cataliza el corte de la cadena lateral del C-10 de varios taxanos), la C-10 deacetilasa (que cataliza el corte del acetato del C-10 de varios taxanos), y la C-7 xilosidasa (que cataliza el corte de la xilosa del C-7 de varios xilosiltaxanos). Esta estrategia permitió un incremento en la cantidad recuperada de 10-DAB III, y por consecuencia de taxol semisintético (Ramesh, 1998).

El método semisintético es actualmente una de las rutas comercialmente viables de producción de taxol (Jennewein y Croteau, 2001; Frense, 2006). Sin embargo, este método se ve limitado por la extracción de los precursores (10-diacetilbaccatina III) del material vegetal que: (1) dependen de la variación significativa en su contenido de taxanos debido a los factores epigenéticos (fenómenos que no afectan la secuencia de ADN de los genes pero que sí varían su expresión) y ambientales, (2) es limitado por el crecimiento lento de los tejidos, y (3) implica la purificación difícil y costosa de los precursores a partir del tejido vegetal dado a las abundantes resinas fenólicas, lípidos y otros contaminantes que se encuentran en la planta.

## **2.12 Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios**

La elicitación es una estrategia efectiva para incrementar la producción o inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios en los cultivos *in vitro* de varias especies vegetales. (Chong *et al.*, 2005).

Se define como elicitador a aquellas moléculas que estimulan las defensas o respuestas de eventos de estrés inducidas en las plantas, estos compuestos son capaces de disparar los mecanismos de defensa vegetal entre los que se encuentran la respuesta hipersensitiva,

producción de especies reactivas de oxígeno, activación de genes relacionados con la defensa, así como también la síntesis de fitoalexinas. Además de la importancia biotecnológica, la elicitación se ha utilizado para estudiar las interacciones planta-patógeno y las respuestas de defensa vegetales así como también rutas de señalización involucradas con el proceso mismo.

En este sentido se han descrito componentes múltiples en la ruta de transducción de señales que regulan la expresión de genes y de los cambios bioquímicos involucrados como ocurre por ejemplo con la cascada de transducción de señales del ácido jasmónico que regula un diverso juego de respuestas inducidas por elicitación (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2008).

Los elicitores interactúan con los receptores sobre las células huéspedes, que posteriormente favorecen el transporte de la señal primaria en la membrana plasmática, el citosol y/o el núcleo. La inducción de algunos genes de defensa requiere de la generación de moléculas señal secundarias endógenas por parte de las células atacadas en el sitio de infección (Qin y Lanb, 2004).

Existe una gran variedad de agentes elicitores tanto bióticos como oligo y polisacáridos, péptidos, proteínas, lípidos, ergosterol y ácido jasmónico entre otros y abióticos entre algunos ejemplos de estos elicitores están; estrés salino usando cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de potasio (KCl), estrés osmótico usando sorbitol, manitol, polietilen glicol, polivinil pirrolidona y alginato de sodio, estrés por metales pesados con sales inorgánicas de vanadio y algunos elementos pertenecientes a la familia de las tierras raras, que se han estado utilizando para incrementar la producción de metabolitos secundarios (Zhao y Verpoorte 2007). Estos agentes se pueden adicionar de manera individual a manera de generar solo un tipo de estrés o bien pueden utilizarse dos agentes diferentes (Zhao y Verpoorte, 2007).

La percepción de los elicitores dispara varias rutas de señalización, usualmente iniciando con un flujo de entrada de calcio y un estallamiento oxidante, seguido por la síntesis de moléculas señal tales como el ácido salicílico y etileno (Radman *et al.*, 2003). Los genes relacionados con la defensa conducen a un reforzamiento de las paredes de las células vegetales y se induce la acumulación de compuestos antimicrobianos tales como fitoalexinas, y la síntesis de proteínas que hidrolizan o inhiben la actividad microbiana.

La interacción de las plantas con patógenos puede iniciar una respuesta rápida y de manera localizada en el sitio de infección, de esta manera la percepción de varios de los compuestos liberados por el patógeno (enzimas, polisacáridos, proteínas, etc.) conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno y/o de moléculas de señalización (ácido jasmónico) en las células vegetales (Yu *et al.*, 2002, Memelink y Gantet, 2007).

### **2.12.1 Elicitación**

La elicitación se puede definir como la inducción de la producción de fitoquímicos mediante moléculas o tratamientos denominados elicitores. Los elicitores pueden clasificarse en: 1) elicitores bióticos, los cuales son normalmente moléculas derivadas de microorganismos que estimulan el metabolismo secundario, en éstos se encuentran polisacáridos, glicoproteínas, compuestos orgánicos de bajo peso molecular y paredes celulares de bacterias y hongos, 2) elicitores abióticos tales como la luz UV, metales pesados y otros compuestos, y 3) los elicitores endógenos, donde se consideran a las moléculas que se producen en el interior de las células como mensajeros secundarios, tal es el caso del ácido jasmónico y el jasmonato de metilo (Singh, 1999).

Las plantas frente a una amenaza como el ataque de patógenos, insectos o un estrés abiótico, responden activando diferentes mecanismos de defensa incluyendo la inducción de la

biosíntesis de metabolitos secundarios, como fitoalexinas o con barreras defensivas, como es la deposición en la pared celular de toxinas (He *et al.*, 2002). Los factores que inducen la formación de fitoalexinas reciben el nombre de elicitores, éstos pueden ser fragmentos de la pared celular de diferentes microorganismos, o enzimas tipo pectinasas y celulasas, que dan lugar a fragmentos de la pared celular que actuarán como elicitores. Del mismo modo que pueden ser algunos fragmentos pépticos, oligosacáridos, glicopéptidos o lípidos (Ebel y Cosio, 1994) y elicitores abióticos como algunos iones de metales pesados (Cuadro 13).

**Cuadro 13. Clasificación de elicitores.**

Elicidores bióticos		Elicidores abióticos	
Compuestos específicos	Mezcla compleja	Químicos	Físicos
Quitosano	Extracto de levadura	Sulfato de vanadilo	Estrés térmico
Alginato	Esporas de hongos	Sales de metales pesados	Estrés osmótico
Pectina	Mezcla de hongos	Ortovanadato de sodio	Irradiación por UV
Jasmonato de metilo			Heridas

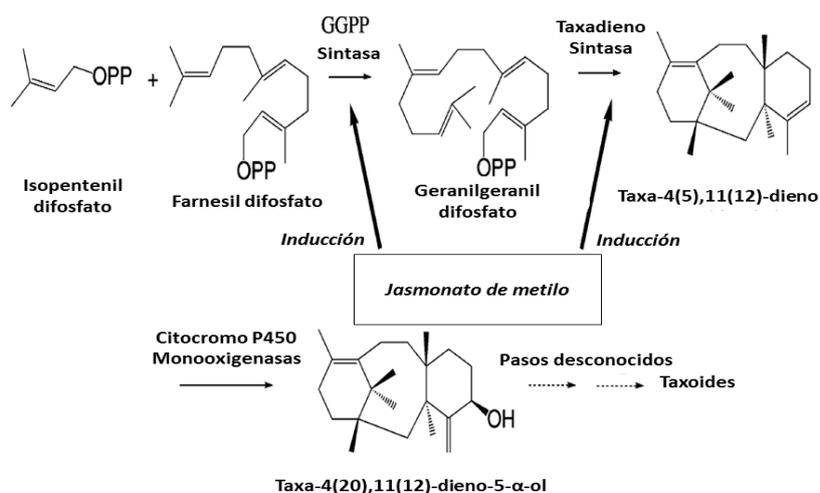
Ebel y Cosio, 1994.

La principal función de los elicitores, en biotecnología es su capacidad para ser inductores del metabolismo secundario, de esta manera pueden provocar la acumulación de un compuesto tanto en la planta entera como en el cultivo de tejidos vegetales (Yu *et al.*, 2002). Numerosos estudios han indicado que en determinados cultivos *in vitro* al ser estimulados por elicitores, los metabolitos secundarios son rápidamente producidos en respuesta al tratamiento del elicitador (Di Cosmo y Misawa, 1985). En nuestro caso se utilizó el jasmonato de metilo como elicitador, al etanol y una combinación de butionina de sulfoximina con peróxido de hidrógeno.

### 2.12.2 Jasmonatos

Los jasmonatos han sido investigados en la última década en vista de los efectos que provocan a los cultivos en suspensión, tales como el incremento de la producción de los fitoquímicos, entre otros. En este grupo de sustancias se encuentran el ácido jasmónico y su derivado volátil, el jasmonato de metilo, cuya función en la naturaleza es como hormona de estrés que actúan como reguladores de respuesta de defensa (Memelink *et al.*, 2001).

El jasmonato de metilo (MeJa) es un compuesto que regula la inducción de genes de defensa en plantas y se produce como respuesta a un ataque de hongos o por una lesión. El jasmonato de metilo forma parte de la cadena de señalización ocasionada por la presencia de cualquier elicitor, y aunque se acumula rápidamente después de la elicitación, su presencia es transitoria. Por ello, la aplicación exógena de estos compuestos y su presencia continuada en el medio de cultivo puede ser más efectiva. En la actualidad, se ha demostrado que la aplicación de MeJa incrementa la producción de compuestos del metabolismo secundario, como es el caso de flavonoides, antraquinonas, alcaloides y taxoides (Figura 16 y Figura 17) (Gundlache *et al.*, 1992).





### 2.12.4 Diferencias entre el ácido jasmónico y metil jasmonato

Los jasmonatos median varios eventos en células vegetales tales como las respuestas de defensa, floración y senescencia a través de señales intracelulares y la expresión de un gran número de genes que parecen estar regulados por jasmonatos (Figura 18). También modulan varios eventos fisiológicos tales como la resistencia a insectos y patógenos, maduración del fruto, maduración del polen, crecimiento de la raíz y la senescencia (Camarena, 2002).

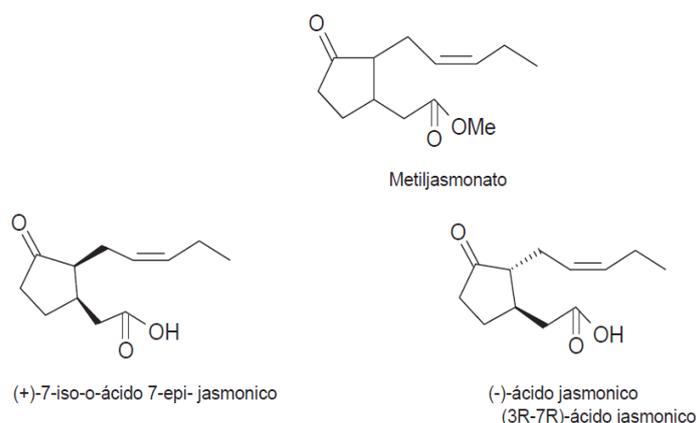


Figura 18. Estructuras del jasmonato de metilo y las dos formas epiméricas del ácido jasmónico aislados de plantas. El (3R, 7S)-ácido jasmónico también es conocido como (+)-7-iso- o 7-epi-ácido jasmónico, es formado biosintéticamente, pero convertido en ácido o base a través de procesos de enolización al isómero trans más estable 3R, 7R-ácido jasmónico el cual es el isómero predominantemente extraído de tejidos intactos (Camarena, 2002).

### 2.12.5 Posible esquema para los mecanismos de transducción de señales de elicitores

Todos estos estudios apoyan la hipótesis de que los estímulos externos como los son los elicitores causan un aumento en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico a través del ciclo del fosfatidilinositol y sistema de la adenilato ciclasa (Figura 19). Se ha acumulado evidencia que sugiere que las células vegetales contienen los principales componentes del ciclo del fosfatidilinositol, y de AMPc. Esta clase de mecanismo de transducción de la señal es inusual (Kaplan *et al.*, 2007), y es infrecuente en células animales y microbianas.

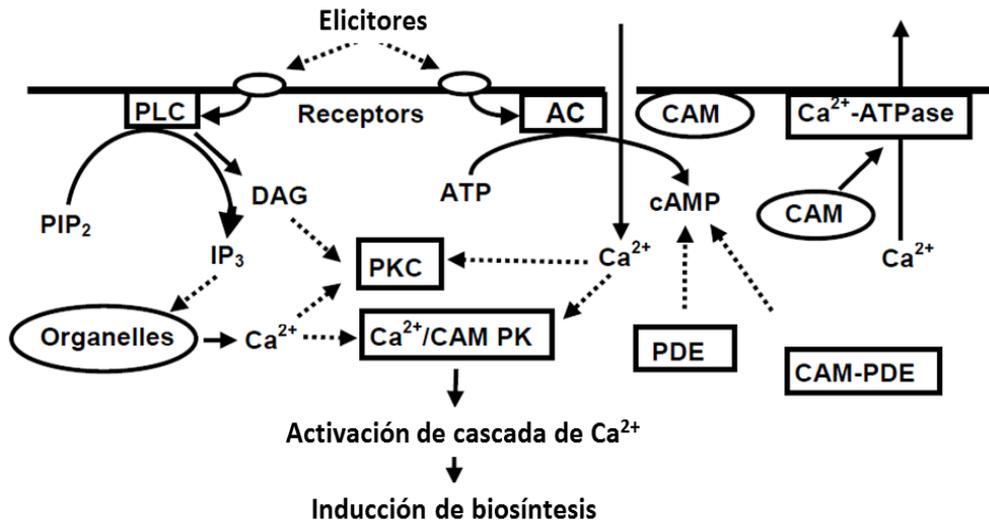


Figura 19. Esquema de los mecanismos de transducción de señales por medio de elicitores (Kaplan *et al.*, 2007).

### 2.12.6 Los jasmonatos y su relación con el metabolismo secundario vegetal

Los jasmonatos, el ácido jasmónico y el metil jasmonato (MJ), son hormonas vegetales esenciales que regulan las respuestas de defensa frente a los factores de estrés ambientales, como la sequía, heridas, y la infección microbiana.

También se ha demostrado que las múltiples actividades fisiológicas celulares de los elicitores pueden ser a veces sustituidas por el ácido jasmónico y MJ, y la aplicación exógena de jasmonatos a las células vegetales incrementa la acumulación de una variedad de metabolitos secundarios. Los estudios recientes sobre los mecanismos de transducción de señales de jasmonatos han demostrado (Turner *et al.*, 2002) que la forma activa de los jasmonatos es un amino ácido conjugado, jasmonoil-isoleucina, y estos aductos se asociarían con un complejo de proteínas que funcionan como el receptor de esta hormona vegetal. También se ha demostrado que la cascada de señalización de jasmonatos enlaza a procesos de degradación de proteínas mediada por proteosoma-ubiquitina, sin embargo, hay muy poca

información disponible sobre el detalle del mecanismo por el cual los jasmonatos inducen la biosíntesis de varios metabolitos secundarios en células vegetales.

### **2.12.7 Modelo biológico de la transducción de señales en *Taxus* spp.**

La ruta de transducción de señales en cultivos en suspensión de *T. chinensis* se induce por oligosacáridos de *Fusarium oxysporum*. La vía consta de tres redes locales de transducción de señales. En la red local I, el oligosacárido se une con el receptor de proteína quinasa de tirosina que se encuentra en la membrana celular acoplada con proteínas G. La interacción entre el oligosacárido y el receptor se lleva a cabo dentro de 15 min después de la elicitación. La proteína G se fosforila por la proteína G-GTP abriendo la red de la señal de transducción comenzando aproximadamente 30 minutos después de la elicitación (Ying *et al.*, 2002).

En la red local II, PLC y los canales de iones son activados por proteínas G, lo que lleva a la producción de trifosfo-inositol (IP3) y diacilglicerol formando el sistema de doble mensaje. Esta reacción se lleva a cabo cerca de 60 minutos después de la elicitación. La activación de los canales iónicos promueve la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y el IP3 estimula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el orgánulo que resulta en el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta reacción se inicia en aprox. 45 minutos después de la elicitación (Ying *et al.*, 2002).

En la red local III, la proteína quinasa es activada por altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y diacilglicerol y cataliza la fosforilación y desfosforilación de proteínas (Subramaniam *et al.* 1997), transmitiendo las señales al núcleo celular y la promoción de la expresión de genes de defensa y por lo tanto favorecer la producción de taxol. En cada una de las tres redes locales de la explosión o estallamiento oxidativo se produce por las reacciones pertinentes. Parece que existe un generador de explosión oxidativa en las células. El estallamiento

oxidativo provoca un aumento en el potencial redox en las células e incrementa los metabolismos primario y secundario, tales como la polimerización de compuestos fenólicos inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incrementando la habilidad de defensa de las células. Cuando la intensidad de la señal de la explosión oxidativa llega a un cierto grado, la expresión de genes relevantes al metabolismo secundario en el núcleo celular comienza a ser elicitado (Ying *et al.*, 2002), (Figura 20).

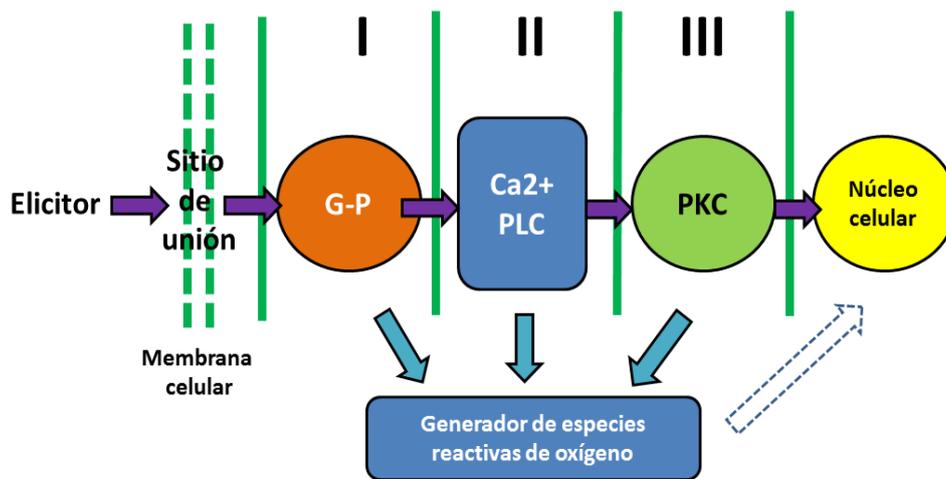


Figura 20. Un modelo físico de transducción de señales de *Taxus chinensis* var. *mairei* inducida por un oligosacárido. G-P: proteína G, PLC: fosfolipasa C, PKC: proteína quinasa C (Ying *et al.*, 2002).

Los resultados de un análisis de transcriptoma sugieren que la aplicación exógena de jasmonato de metilo (MeJA) podría inducir la biosíntesis de ácido jasmónico (JA), la ruta de señalización de JA y respuestas de defensa, activando una serie de factores de transcripción, así como el aumento de la expresión de los genes en la ruta de biosíntesis de terpenoides responsables de la síntesis de taxol. Esta completa descripción de la información de la expresión génica podría facilitar en gran medida nuestra comprensión acerca de los

mecanismos moleculares de la biosíntesis de los taxoides mediados por MeJA en células de *Taxus* (Shu *et al.*, 2012).

El MeJA estimula un gran número de genes implicados en varias categorías funcionales, como la biosíntesis de hormonas de plantas y biosíntesis de fenilpropanoides. Además, muchos genes que codifican factores de transcripción, responden a la elicitación con MeJA (Shu *et al.*, 2012).

### **2.12.8 El peróxido de hidrógeno como agente elicitor**

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en organismos eucariontes actúa como un segundo mensajero en la transducción de señales a través de su reacción con ciertas proteínas que contienen residuos de cisteína. El mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno consiste en producir efectos oxidantes: produce  $OH^\cdot$  y radicales libres que atacan una amplia variedad de compuestos orgánicos (entre ellos, lípidos y proteínas que componen las membranas celulares de los microorganismos). La enzima catalasa presente en los tejidos degrada rápidamente el peróxido de hidrógeno, produciendo oxígeno, que dificulta la germinación de esporas anaerobias.

Estas reacciones de señalización involucran oxidaciones reversibles catalizadas por peroxiredoxinas y otras enzimas todavía no identificadas que resultan en uniones disulfuro intramolecular o una diversa mezcla de proteína-glutación (Forman, 2008).

En las plantas la generación de  $H_2O_2$  se incrementa en respuesta a varios tipos de estrés, implicando a este compuesto como una señal de los fenómenos de aclimatación y tolerancia (Neill *et al.*, 2002). El peróxido de hidrógeno también puede ser generado por enzimas específicas de los sistemas enzimáticos xantina oxidasa, amino oxidasa, y peroxidasas de pared celular. Un estallamiento oxidativo con una rápida síntesis y liberación de  $H_2O_2$  en el

apoplasto es una respuesta común a patógenos, elicitores, daño, calor, luz ultravioleta y ozono.

Es posible que el alto estado antioxidante de las células prevenga la migración del  $H_2O_2$  lejos de la célula, consecuentemente las respuestas al peróxido de hidrógeno pueden ser localizadas en micro-dominios dentro de la célula, a los que también se le han llamado puntos calientes de peróxido (Neill *et al.*, 2002).

Se ha reportado que en el apoplasto son generados relativamente grandes cantidades de peróxido, y que solamente corresponde a una pequeña proporción de la capacidad antioxidante celular.

El peróxido puede rápidamente movilizarse dentro de la célula y ser metabolizada. Tal movilización puede ser facilitada por “peroxiporinas” que han sido especulados que junto con los canales de agua, o acuaporinas, pueden también servir como conductores para el transporte de  $H_2O_2$  trasmembrana (Neill *et al.*, 2002).

Uno de los recientes usos del  $H_2O_2$  se ha enfocado en la inducción de metabolitos secundarios, de esta manera la aplicación exógena de este compuesto se realizó para estudiar su papel en la inducción de metabolitos secundarios con acción biológica conocidos como fitoalexinas en frutos de *Capsicum annuum* L (Arreola-Cortés *et al.*, 2007).

Por otro lado en cultivos de células de *A. thaliana* el  $H_2O_2$  o bien formación de éste en el cultivo *in vitro*, induce la expresión de la enzimas fenilalanina amonio-liasa (PAL por sus siglas en ingles) y glutatión S-transferasa. Cabe destacar que la inducción de la enzima PAL está relacionada con la formación de fitoalexinas y de ácido salicílico. Además la aplicación exógena de  $H_2O_2$  conduce a la activación de proteínas cinasas MAP (Hancock *et al.*, 2002).

### 2.12.9 Butionina de sulfoximina

Se sabe que la presencia de metales pesados y la inhibición del glutatión inducen el estrés oxidativo en los cultivos celulares, incrementando la producción de metabolitos secundarios antioxidantes y algunos alcaloides en cultivos celulares. Un inhibidor de la biosíntesis del glutatión es el uso de la sulfoximina de butionina (BSO). La butionina de sulfoximina (BSO, Figura 21) es una sulfoximina utilizada en quimioterapia para reducir los niveles de glutatión. Este compuesto inhibe la gamma-glutamylcisteina sintetasa, enzima requerida en el primer paso de la síntesis del glutatión.

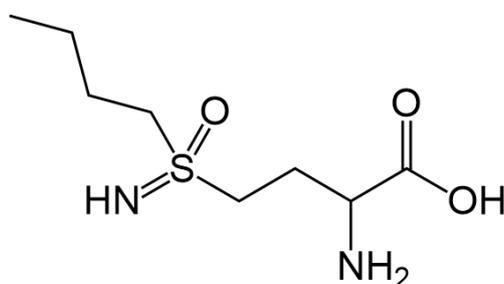


Figura 21. Estructura química de la molécula de butionina de sulfoximina. Fórmula molecular: C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, masa molar: 222.305 g/mol (ChemDraw, 2011).

### 2.12.10 Funciones y metabolismo del glutatión

El tripéptido glutatión (GSH,  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) es sintetizado en el citoplasma de las células por la acción consecutiva de dos enzimas:  $\gamma$ -glutamyl-cysteine ( $\gamma$ -GluCys) sintetasa (también conocida como glutamato cisteína ligasa, GCL por sus siglas en inglés) que utiliza glutamato y cisteína como sustrato para formar el dipéptido  $\gamma$ -glutamylcisteína, el cual es combinado con la glicina en una reacción catalizada por la glutatión sintetasa para formar GSH. El trifosfato de adenosina (ATP) es donador de energía para ambas enzimas. Las concentraciones intracelulares de glutatión son reguladas por la inhibición de la  $\gamma$ -GluCys

sintetasa por el producto final, GSH. Así, existe un equilibrio celular entre la síntesis y el consumo de este metabolito (Ballatori *et al.*, 2009) (Figura 22).

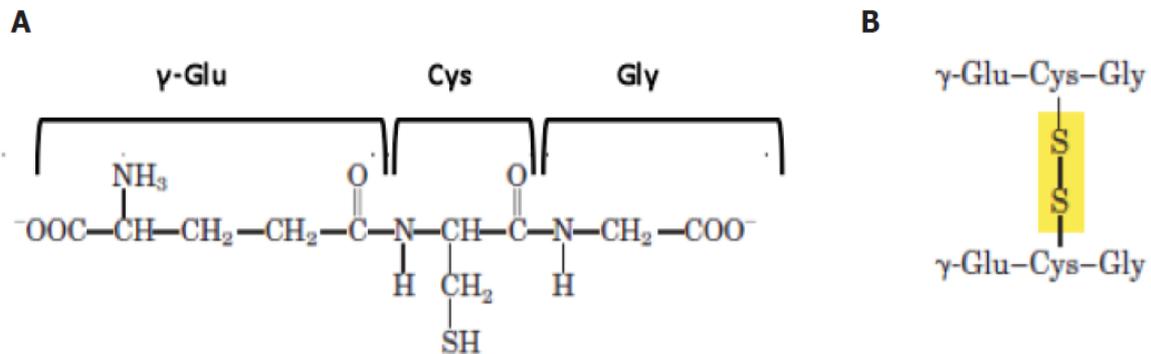


Figura 22. Representación de: A, glutatión reducido (GSH) y B, glutatión oxidado (GSSG). El GSH está constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. En el caso del GSSG son dos moléculas unidas por un puente disulfuro formado por las cisteínas (Martínez *et al.*, 2011).

### 2.12.11 Funciones del glutatión

El glutatión es esencial para la proliferación celular y tiene un papel importante en la apoptosis, ya que la disminución de la cantidad de glutatión es permisiva para la activación de caspasas y la progresión de los mecanismos de apoptosis (Franco y Cidlowski, 2009).

Una función muy importante del glutatión es mantener el potencial de óxido-reducción de la célula, ya que mantiene en estado reducido los grupos tiol de las proteínas y así permite la generación de diversas cascadas de señalización intracelular; un ejemplo es la proteína cinasa C, que contiene varios residuos de tirosina en su centro catalítico, que le confieren sensibilidad al estado redox de la célula, lo que puede afectar la señalización mediada por esta enzima (McEligot *et al.*, 2005).

### 2.12.13 Metabolismo del glutatión

Durante la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (EROS), el glutatión está involucrado en dos tipos de reacciones: la interacción no enzimática con radicales como el

anión superóxido, óxido nítrico y radical hidroxilo; otra forma es proporcionando un electrón para la reducción de peróxidos en la reacción catalizada por la GPx. El producto final de la oxidación de GSH es glutatión oxidado (GSSG, constituido por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro) que es regenerado por la glutatión Reductasa (GR), esta enzima transfiere electrones del NADPH al GSSG, reduciendo esta molécula (Martínez *et al.*, 2011).

#### **2.12.14 Eventos bioquímicos del estrés oxidativo**

Las plantas en su ambiente están expuestas a diferentes tipos de estrés, los cuales pueden cambiar su fisiología, morfología y desarrollo. Se ha propuesto que el estrés biótico (patógenos, JA), estrés mecánico o estrés abiótico (sequía, sales, frío, calor, metales, radiación UV, presión osmótica, falta de nutrientes) puede llevarse a cabo vía estallamiento oxidativo (Apel y Hirt, 2004; Quan *et al.*, 2008).

El  $H_2O_2$  actúa como molécula señal que activa una respuesta al estrés, regulando el desarrollo y adaptación a estas condiciones, activando el mecanismo de defensa o la muerte celular (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004; Hung *et al.*, 2005). Durante el estallamiento oxidativo, hay un incremento transitorio en las EROS, las cuales, son formas reducidas del oxígeno atmosférico ( $O_2$ ) que resultan de la excitación del mismo a su forma singulete ( $O_2^1$ ) o por la transferencia de uno, dos o tres electrones, formando el radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) o el radical hidroxilo ( $HO^-$ ) respectivamente. En condiciones normales la producción de ERO en las células (fotosíntesis y respiración) es baja ( $240 \mu M$  de  $O_2^-$  y  $0.5 \mu M$  de  $H_2O_2$ ). Durante condiciones de estrés esta homeostasis celular se rompe y los niveles de ERO incrementan ( $240-720 \mu M$  de  $O_2^-$  y  $5- 15 \mu M$  de  $H_2O_2$ ) (Mittler, 2002). Existen dos mecanismos de detoxificación para regular la concentración de las ERO, el

enzimático y el no enzimático. El mecanismo enzimático está formado por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasas (POD). Las rutas más importantes donde intervienen estas enzimas son: el ciclo agua-agua en los cloroplastos; el ciclo ascorbato-glutación en cloroplastos, citosol, mitocondria, apoplastos y peroxisomas; el ciclo glutación peroxidasa y la catalasa en peroxisomas. El mecanismo no enzimático es aquel compuesto por moléculas antioxidantes dentro de la célula tales como glutación y ácido ascórbico, los cuales son cruciales para la integridad celular durante el estrés oxidativo (Apel y Hirt, 2004).

#### **2.12.15 Determinación de viabilidad celular**

La viabilidad se define como la capacidad de la célula o el organismo para vivir. Muchas veces, la viabilidad va acompañada por un aumento en la biomasa del cultivo celular (Malinin y Perry, 1967), sin embargo en muchos casos un descenso de temperatura o la utilización de reactivos que actúen como inhibidores del metabolismo pueden provocar una disminución de la biomasa, pero no por ello la muerte celular (Malinin y Perry, 1967).

Los fluorocromos tienen la capacidad de excitarse delante de la radiación ultravioleta, esta energía es absorbida y posteriormente emitida en forma de luz fluorescente a una longitud de onda superior. De este modo, los fluorocromos permiten ser utilizados para marcar estructuras o procesos del interior de la muestra (Malinin y Perry, 1967).

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el fluorocromo: diacetato de fluoresceína (DAF). El DAF (Figura 23) actúa sobre las células vivas, no es fluorescente y penetra fácilmente en el interior de la célula donde es hidrolizado por las esterasas (enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis) presentes en la membrana celular y en el citoplasma, debido a la ruptura de los enlaces éster del FDA dejando libre la fluoresceína que es el

compuesto que da la fluorescencia ( $\lambda_{\text{excitación}}$  490 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$  514 nm fluorescencia verde)  
(Vitecek *et al.*, 2007).

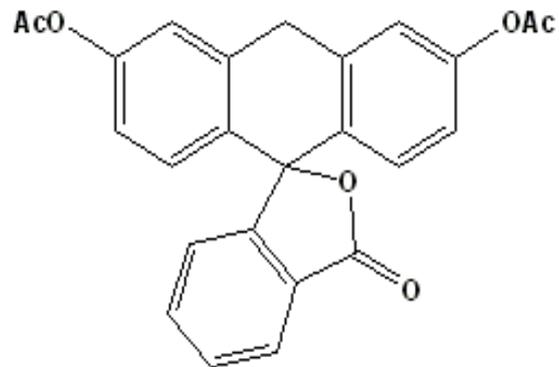


Figura 23. Estructura química del diacetato de fluoresceína, peso molecular: 416.39, fórmula molecular:  $C_{24}H_{16}O_7$  (ChemDraw, 2011).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Se utilizaron acículas de material élite de *Taxus globosa*, del vivero forestal del Colegio de Postgraduados. Explantes de 0.5 cm se desinfectaron en la superficie, con una disolución de hipoclorito de sodio comercial al 10%, durante 3 min, luego se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril y una vez con etanol, durante 1 min.

#### 3.2 Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo B5 (Gamborg *et al.*, 1968), cuya composición se muestra en el Cuadro 14. Se utilizó como fuente de carbono a la sacarosa (20 g L<sup>-1</sup>). Se utilizó como agente gelificante phytigel (2 g L<sup>-1</sup>).

Cuadro 14. Composición del medio de cultivo de Gamborg *et al.*, (1968).

SALES INORGÁNICAS		
Macronutrientes		
	mg L <sup>-1</sup>	(mM)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-
KNO <sub>3</sub>	2500	24.8
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	150	1.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250	1.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	130.5	0.9
Micronutrientes		(μM)
KI	0.75	5.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.0	49
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10.0	59
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.0	7.0

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	1
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.1
CoCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0.025	0.1
Quelatos		(μM)
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	100
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	-
VITAMINAS (Orgánicos)		(μM)
Myo-inositol	100	550
Ácido Nicotínico	1.0	8.2
Piridixona.HCl	1.0	0.45
Tiamina.HCl	10.0	30
Sacarosa	2 %	
pH	6.1-6.2	

Se utilizaron como reguladores del crecimiento picloram (PIC) y ácido naftalen acético (NAA). Para la preparación de las soluciones de reguladores de crecimiento, se adicionó 300 μL de NaOH (1N) o HCl (1N) por cada 10 mg de auxina o de citocinina, respectivamente (Hurtado y Merino, 1991). Después del aforo se ajustó el pH a 6.2 con NaOH y los medios se esterilizaron a 15 psi/121°C durante 15 min.

### 3.3 Callos de *Taxus globosa*

Los explantes de hojas de *T. globosa* se establecieron en frascos con 10 mL de medio de cultivo sólido y se incubaron en oscuridad. Se cultivaron en tres medios suplementados (Cuadro 15).

Cuadro 15. Lista de concentraciones utilizadas para la inducción de callos de *T. globosa*.

Tratamientos	Concentraciones
1	4.14 $\mu$ M de PIC y 0.4 % de PVP
2	5 $\mu$ M de PIC y 10 $\mu$ M de NAA
3	10.74 $\mu$ M de NAA

### **3.3.1 Extracción de taxoides con metanol en hojas y callos de *Taxus globosa* para análisis de cromatografía líquida (Enaksha *et al.* 1993)**

Se liofilizaron muestras de callos; de éstas se utilizaron 50 mg de biomasa seca por muestra que se diluyeron en 1.5 mL de metanol y se disolvió en un homogeneizador Omni-mix durante 2 min. Posteriormente se realizó una sonicación durante 5 min. Se transfirió el extracto a un tubo Eppendorf de 2 mL. Se centrifugó para sedimentar los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante que se filtró a través de un filtro de nylon de 0.2 micrones. Se ajustó el volumen final a 1.5 mL con metanol. El extracto resultante se analizó por HPLC.

### **3.3.2 Extracción de taxoides con diclorometano en hojas y callos de *Taxus globosa* para análisis por cromatografía líquida**

Se secaron callos de 30 y 40 días a temperatura constante (50 °C por 48 h). Se maceró el tejido seco en un mortero de porcelana. Se pesaron 0.8 g del polvo de callos y se diluyeron con 20 mL de metanol durante 48 h. Se filtró y se centrifugó a 4000 x g durante 3 min. Se evaporó el sobrenadante bajo presión reducida a 30 °C. Se diluyó el residuo con 60 mL de volumen igual de diclorometano-agua destilada durante 48 h. La fase orgánica, se colectó a través de un embudo de separación y se evaporó a sequedad. Se disolvió el residuo en 0.6 mL con metanol grado HPLC (Barrios *et al.*, 2009).

### **3.3.3 Cromatografía en placa fina de alta resolución (HPTLC) de taxoides en el follaje de *Taxus globosa***

Se secó el follaje de muestras provenientes de un vivero forestal de *T. globosa* a 40 °C, y se pesó 0.5 g de follaje, éste se maceró en un mortero con pistilo de porcelana y se agregaron 2 mL de metanol frío, el sobrenadante se colocó en un tubo para centrifuga, se lavó el mortero una sola vez con metanol y se adicionó metanol hasta completar un volumen de 4 mL. Se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min, el sobrenadante se separó y se aplicó en una cromatoplaque de HPTLC (Merck) de 5 x 5 cm de sílica gel 60-F<sub>254</sub>, junto con los tres estándares de taxoides: taxol, cefalomanina y 10 diacetil baccatina. Posteriormente se colocó la cromatoplaque de HPTLC en una cámara de elución con una mezcla de solventes de benceno-cloroformo-acetona-metanol con una proporción de 20:92.5:15:7.5 y se dejó eluir, posteriormente se retiró la cromatoplaque de la cámara, se dejó secar por 5 min y se reveló con el reactivo de anisaldehído.

### **3.3.4 Cromatografía en placa fina de alta resolución (HPTLC) en callos de *Taxus globosa***

Se utilizaron placas de HPTLC (Merck) de 5 x 5 cm de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, se marcó con lápiz las distancias correspondientes en las placas. Se tomó con un tubo capilar cada uno de los estándares de taxoides: taxol, cefalomanina y 10-deacetil baccatina y se disolvieron con 50 µL de metanol, se aplicaron 50 µL en las placas. Las muestras de callo se liofilizaron y se colocaron en frascos de color ámbar, se les añadieron 100 µL de metanol y 100 µL de agua desionizada. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min, luego durante 10 min a 6000 rpm. Posteriormente se colocó la cromatoplaque de HPTLC en una cámara de elución con una mezcla de solventes de benceno-cloroformo-acetona-metanol con una proporción de 20:92.5:15:7.5 y se dejó eluir, posteriormente se retiró la cromatoplaque de la cámara, se dejó

secar por 5 min y se reveló con el reactivo de anisaldehído. La fase móvil se preparó después de aplicar las muestras (10 µL) sobre la placa.

### **3.3.5 Extracción de taxoides en callos de *Taxus globosa***

Primer método: los callos de *T. globosa* se deshidrataron a 50°C durante 5 días, se homogeneizaron en un mortero. La muestra pulverizada se pesó, se adicionaron 20 mL de metanol y se incubó durante 48 h dentro en un tubo Falcon de 50 mL a temperatura de laboratorio; posteriormente se filtró, se centrifugó a 4000 g por 3 min y se evaporó el disolvente en un rotavapor a 30°C. El residuo se diluyó en un volumen 2:1 con diclorometano/agua destilada (10/5 mL) y se reposó por 1 h en un embudo de separación, posteriormente el embudo se agitó 3 veces y la fase orgánica se evaporó. La solución se filtró a través de una columna de purificación RP-18 con cuatro gradientes de metanol: 100, 35, 55 y 65%. 10 µL del extracto al 65% del extracto se colocaron en una placa de sílica y se eluyó en una fase cuaternaria de tolueno: cloroformo: acetona: metanol (20:92.5:15:7.5).

Segundo método: Se secaron callos de *T. globosa* a 50°C por 5 d, el material seco se pesó y se homogeneizó con 1.5 mL de metanol por 2 min y se sonicó la solución por 5 min, ésta se centrifugó para sedimentar los desechos celulares. Se tomaron 3 mL de muestra y se diluyeron en 4 mL de metanol, la solución se filtró a través de una columna de purificación RP-18 con 4 gradientes de metanol: 100, 35, 55 y 65%. Se tomó la muestra y se adicionaron 10 µL del extracto en una placa de sílica y se eluyó con la mezcla de benceno: cloroformo: acetona: metanol (20:92.5:15:7.5).

### **3.3.6 Cromatografía en placa fina de esteroides en callos de *Taxus globosa***

Se utilizaron placas para TLC de 20 x 20 cm (Alugram Nano-SIL G/UV 254). Se colocaron 10 µL de cada esteroide (Sigma Chemical Co), por su orden de aplicación fueron: 1. sitosterol, 2. campesterol, 3. estigmasterol, 4. escualeno, 5. fitol; después, los extractos de callos: 6.

extracto de callo 1, 7. extracto de callo 2; y luego los estándares de los taxoides analizados en esta investigación: 8. 10 diacetil baccatina III, 9. cefalomanina y 10. taxol. La cromatoplaque se eluyó dentro de una cámara de vidrio, la fase móvil consistió de una fase cuaternaria compuesta de benceno, cloroformo, acetona y metanol en una proporción de 20:92.5:15:7.5 mL. Se dejaron migrar los compuestos aproximadamente 1 h, después se retiró la cromatoplaque y se reveló con el reactivo cromogénico de anisaldehído.

### 3.4 Cultivo de células en suspensión de *Taxus globosa*

Se utilizaron callos friables y de color verde los cuales se suspendieron en medios de cultivo líquidos con diferentes concentraciones y combinaciones de fitohormonas (Cuadro 16).

Cuadro 16. Tratamientos y concentraciones de fitohormonas utilizadas para el cultivo de células.

Tratamiento	Fitohormonas
1	10.74 $\mu$ M de NAA
2	10.74 $\mu$ M de NAA + 5 $\mu$ M de CIN
3	5.35 $\mu$ M de NAA + 5 $\mu$ M de BAP
4	10.74 $\mu$ M de NAA + 3.33 $\mu$ M de PIC
5	4.14 $\mu$ M de PIC + 0.2% de PVP

NAA: ácido naftalen acético, CIN: cinetina, BAP: bencil amino purina, PIC: picloram, PVP: polivinilpirrolidona.

### 3.5 Inoculación de células por peso

Se procedió a realizar la inoculación de células por peso fresco con los medios de cultivo NAA y NAA/PIC, cultivos que presentaron el mejor crecimiento, cada matraz contenía 50 mL de medio de cultivo líquido, por lo que se utilizó un inóculo al 10% (p/v), por lo tanto se pesó 5 g de células en una balanza Ohaus que se transfirió a matraces Erlenmeyer previamente tarados sin tapón de 250 mL con 100 mL de medio y se agitó vigorosamente

para resuspender a las células, posteriormente se colocó cada matraz en una plataforma giratoria a 110 rpm, los matraces se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los cultivos *in vitro* de células se mantuvieron subcultivándolos para renovarles el medio de cultivo líquido.

### **3.6 Mantenimiento de los cultivos de células en suspensión de *Taxus globosa***

Callos de *Taxus globosa* friables y de color verde cristalino proporcionados por la Dra. Ramos-Valdivia del Laboratorio del Departamento de Biotecnología de Células Vegetales del CINVESTAV Unidad-Zacatenco, se mantuvieron y crecieron en medio de cultivo B5 (Gamborg *et al.* 1968), con  $13.4\text{ }\mu\text{M}$  de ácido naftalenacético (NAA),  $6.72\text{ }\mu\text{M}$  de picloram, (PIC, ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico), 2% de sacarosa como fuente de carbono y pH 6.2 (previo a la esterilización), se colocaron en un agitador orbital a 110 rpm. Se incubaron a una temperatura de  $24 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bajo un fotoperiodo de 16 h con lámparas de luz blanca fluorescente ( $33\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ). Las células crecieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL del medio Gamborg (B5), y se subcultivaron cada 15 d adicionando la misma cantidad de medio fresco a los cultivos celulares y mantenidos así por un año. Los cultivos celulares se mantuvieron en subcultivo para la renovación del medio de cultivo líquido. Posteriormente, las células se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 130 mL de medio de cultivo para su crecimiento. Las células en suspensión se subcultivaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL (con 30 mL de medio) en condiciones de cultivo similares a las anteriores por 6 d, previo a la elicitación.

#### **3.6.1 Crecimiento celular**

Se pesaron 2 g de células de 15 d de edad en una balanza Ohaus y se transfirieron a matraces de 125 mL con 30 mL de medio B5. Se obtuvo una cinética de crecimiento del testigo (células suspendidas en medio de cultivo B5) y los tratamientos de elicitación obteniendo los datos del promedio de dos matraces de cultivo y se determinó el peso celular seco cada 48 h.

El peso seco de las células del control (sin tratamientos) se cosecharon al inicio (0 d) y a los 6, 8 y 10 d. Se determinó el pH en el medio líquido así como el volumen de medio consumido.

### **3.7 Elicitación biótica y cosecha de células**

Se inocularon matraces de 125 mL con 30 mL de medio de cultivo, con diferentes tipos de elicitors en el sexto día (fase de crecimiento celular) añadiendo 50  $\mu$ L de una solución 60  $\mu$ M de jasmonato de metilo (MeJA) al medio de cultivo. Los matraces se cubrieron con un capuchón de papel aluminio, posteriormente, otros matraces se elicitaron con 100 y 300  $\mu$ L de etanol (EtOH-1 y EtOH-2, respectivamente). Otro grupo de células en suspensión fueron elicidadas con una combinación de 0.8  $\mu$ M de butionina de sulfoximina (BSO) y 0.2  $\mu$ M de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En la cosecha, las células de cada matraz se filtraron con vacío y el peso seco fue determinado al colocar las células en una estufa de secado durante 48 h a temperatura de laboratorio. Los experimentos se desarrollaron por duplicado; tanto para las células control como las elicidadas.

### **3.8 Extracción de taxoides**

Las células se maceraron en un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino, éste se colocó en tubos tipo Falcon de 15 mL, envueltos con papel aluminio, se les adicionaron 5 mL de metanol y se mantuvieron en reposo durante 48 h a temperatura del laboratorio. Luego, cada resuspensión se filtró y centrifugó a 3000 rpm, se evaporó el disolvente a 65 °C con vacío. A cada residuo se agregaron 5 mL de diclorometano y 2.5 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 1 h, se utilizó la fase orgánica, después cada solución se evaporó con vacío a 30 °C, finalmente se adicionaron 200  $\mu$ L de metanol puro a cada extracto y se transfirieron a viales de color ámbar mantenidos en refrigeración hasta su análisis por cromatografía de líquidos.

### **3.9 Condiciones estándar de operación del cromatógrafo para la cuantificación de taxoides**

Se analizó y cuantificó el contenido de los taxoides: 10-diacetil baccatina (10-DAB), cefalomanina y taxol utilizando un cromatógrafo de líquidos (Agilent Technologies modelo 1100) con automuestreador, modelo 1200 y detector de arreglo de diodos. Se utilizó una columna Fluophase RP de 150 mm x 4.6 mm de diámetro y tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . El instrumento se calibró a 205 nm de absorbancia. Cada extracto se diluyó con 500  $\mu\text{L}$  de metanol y se filtró a través de un acrodisco de 47 mm de diámetro con membrana de nylon y poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore Co.), se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  en el equipo. El tiempo de análisis fue de 14 min y la fase móvil consistió de acetonitrilo (A) y una solución B de 25% de acetonitrilo en 0.01% de TFA, pH de 3.03 en una proporción de 87:13 y flujo isocrático de 1.8  $\text{mL min}^{-1}$  a 65  $^{\circ}\text{C}$ . Se hizo la curva de calibración con estándares de taxol, cefalomanina y 10-diacetil baccatina, para optimizar el equipo en la lectura de las muestras.

### **3.10 Viabilidad celular**

La viabilidad celular se analizó con el método de tinción que utiliza diacetato de fluoresceína (FDA) por el método reportado por Widholm, 1972. Las muestras celulares se observaron bajo un microscopio (Carl Zeiss, D-7082 modelo MC80 con luz polarizada, Oberkochen, Germany), 1 min después de la aplicación de la solución de FDA.

### **3.11 Análisis estadístico**

La significancia de los efectos de los tratamientos en la inducción de callos se determinó mediante el análisis de la varianza. Las variaciones de los tratamientos se analizaron

mediante el uso de los procedimientos de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los datos se analizaron con el programa SAS.

En el experimento de elicitación de células, se utilizó el diseño de medidas repetidas mediante el análisis de modelos mixtos usando el procedimiento MIXED de SAS.

Las hipótesis a evaluar fueron:

$H_0 = \text{tratamiento 1} = \text{tratamiento 2} = \text{tratamiento 3}$  vs.  $H_a = \text{al menos 1 tratamiento es diferente}$ .

$H_0 = \text{tiempo1} = \text{tiempo2} = \text{tiempo3}$  vs  $H_a = \text{al menos 1 tiempo es diferente}$ .

$H_0 = \text{Existe interacción entre taxoides * tiempos}$  vs  $H_a = \text{no existe interacción}$ .

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Inducción de callos de *Taxus globosa*

La inducción de los callos de *T. globosa* requirió 40 d, el porcentaje mayor se obtuvo con picloram + PVP (Cuadro 17). Los callos tuvieron color verde cristalino y textura friable, esto probablemente porque el medio basal también tuvo influencia directa en la inducción de callos con poca oxidación y mejor respuesta a la inducción. Con los otros dos tratamientos los callos eran de color café (Figura 24). No se presentó contaminación por bacterias ni hongos en los medios de cultivo. Se ha observado que los tejidos jóvenes responden mejor a la formación de callos que los maduros o tejidos jóvenes de árboles adultos (Brunakova *et al.*, 2004).

Cuadro 17. Porcentaje de inducción de callos a partir de acículas.

Tratamiento	Fitorregulador	Inducción de callos (%)	Contaminación por hongos y/o bacterias (%)
1	PIC (PVP)	90 a <sup>1</sup>	0
2	PIC + NAA	70 b	0
3	NAA	50 c	0

<sup>1</sup>Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes (p<0.01).

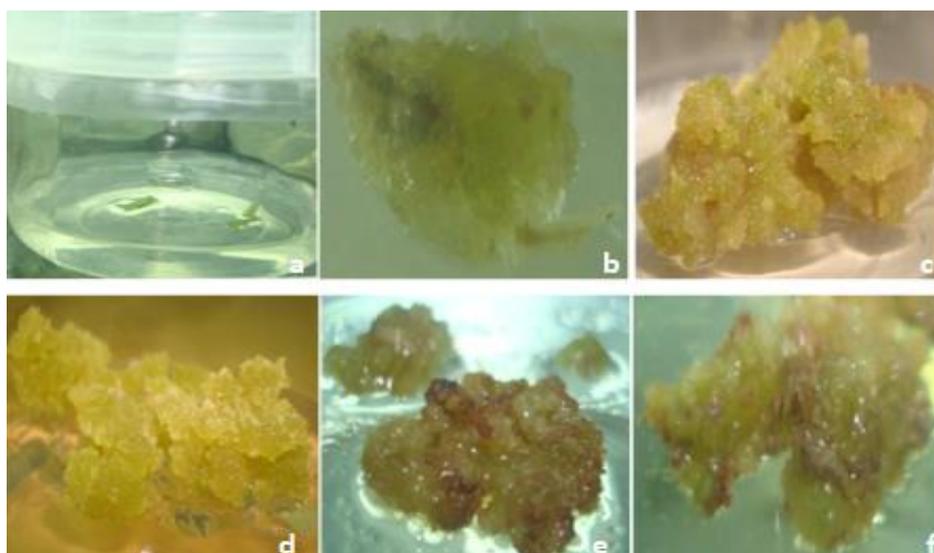


Figura 24. Callos de *T. globosa*. a) explante, b) inducción de callo, c) y d) crecimiento de callo con PIC (PVP), e) oxidación de callo con PIC + NAA, f) callo con NAA.

#### 4.2 Contenido de taxoides en hojas de *Taxus globosa*

La acumulación mayor de taxoides, específicamente de taxol y cefalomanina (un intermediario en la biosíntesis del taxol), se detectó en el extracto crudo con metanol de las hojas (Cuadro 18).

Cuadro 18. Determinación del contenido ( $\mu\text{g g}^{-1}$  p. s.) de taxoides en hojas de *T. globosa*.

Extracto crudo	10-DAB	Cefalomanina	Taxol	Cantidad total
		( $\mu\text{g g}^{-1}$ p. s.)		
Hojas/metanólico	0.518 b <sup>1</sup>	1.684 a	1.418 a	3.620 a
Hojas/diclorometano	1.872 a	0.112 b	0.017 b	2.001 b

<sup>1</sup>Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0.01$ ).

### 4.3 Contenido de taxoides en callos de *Taxus globosa*

El extracto crudo de callos con metanol tuvo la mayor concentración de 10-diacetil baccatina. La acumulación mayor de 10-diacetil baccatina se registró en el extracto crudo metanólico de callos del tratamiento 1.

El extracto crudo metanólico de callos con el tratamiento 2 tuvo la concentración mayor de cefalomanina y taxol. No se detectaron taxoides en el extracto crudo con el tratamiento 3 debido a que los callos tenían un alto grado de oxidación (Cuadro 19). La producción del taxol en los callos depende de la morfología y la edad del árbol. Algunos autores mencionan que los callos producen más taxol cuando son longevos y de color café que cuando son jóvenes y pálidos (Brunakova *et al.*, 2004).

Cuadro 19. Determinación del contenido ( $\mu\text{g g}^{-1}$  p. s.) de taxoides en callos *in vitro* de *T. globosa*.

Extracto crudo	10-DAB	Cefalomanina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ p. s.)	Taxol	Cantidad total
Callos trat. 1*	5.540 a <sup>1</sup>	0.596 a	0.182 b	6.318 a
Callos trat. 2*	0.504 b	0.218 b	2.660 a	3.382 b
Callos trat. 3	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.

<sup>1</sup>Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p < 0.01$ ). \*Extracto crudo metanólico. N.d.: No detectado.

#### 4.4 Cromatografía en placa fina de alta resolución (HPTLC) de taxoides del follaje de *Taxus globosa*

Los extractos de hojas de *Taxus globosa* analizados por HPTLC presentaron un factor de retención similar al estándar de 10-diacetil baccatina, taxoide que tiene el Rf menor entre los analizados en la presente investigación (Cuadro 20), (Figura 28).

Cuadro 20. Rf de las muestras de extracto de hojas de *T. globosa* y de los estándares.

Muestra	Rf (cm)	Color
1. Hojas de <i>Taxus</i>	0.14	Beige
2. Taxol	0.35	Gris
3. 10-diacetil baccatina	0.14	Café
4. Cefalomanina	0.51	Gris
5. Hojas de <i>Taxus</i>	0.14	Beige

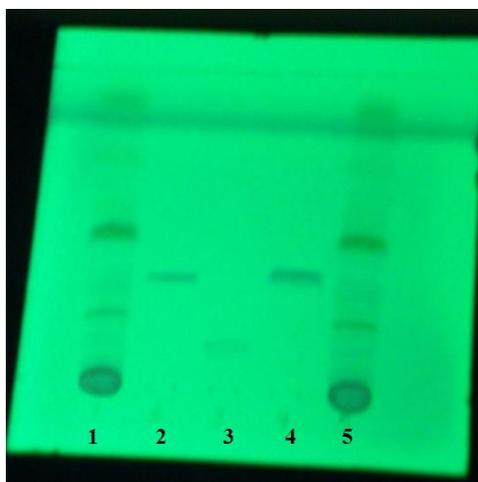


Figura 25. HPTLC de muestras de extractos de hojas de *T. globosa* y estándares. Carril 1. Extracto de hojas de *T. globosa*; Carril 2. Estándar de taxol; Carril 3. Estándar de 10 diacetil baccatina; Carril 4. Estándar de cefalomanina; Carril 5. Extracto de hojas de *Taxus*.

#### 4.5 Análisis de taxoides por cromatografía en placa fina de alta resolución (HPTLC) a partir de callos de *Taxus globosa*

Los callos de *T. globosa* mostraron factores de retención (Rf) diferentes a los estándares (Cuadro 21), esto pudo deberse a la oxidación de los callos.

Cuadro 21. Rf de las muestras de extracto de callos de *T. globosa* y de los estándares.

Muestra	Rf (cm)	Color
1. Taxol	0.17	Gris
2. 10-diacetil baccatina	0.11	Café
3. Cefalomanina	0.20	Gris
4. Callos de <i>Taxus</i>	0	Nulo

#### 4.6 Análisis de esteroides y taxoides por cromatografía en placa fina (TLC) a partir de callos de *Taxus globosa*

La biomasa fresca y seca de callos de *T. globosa* utilizada para la extracción de los taxoides para el primer método fue 9.794 y 0.415 g y 7.085 y 0.513 g para el segundo método

Los resultados de los factores de retención de los esteroides y de los estándares de taxoides se presentan en el Cuadro 22. Las muestras de los extractos de callos tuvieron una baja resolución que impidió observar tanto a los esteroides como a los taxoides, esto se debió a que el método de extracción no fue el adecuado. Siendo la recomendación utilizar un volumen suficiente de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) en lugar de diclorometano. Toda esta mezcla se filtró y al filtrado obtenido se le hace partición con un volumen adecuado de agua. La fase clorofórmica contiene entonces todos los compuestos liposolubles tales como esteroides, triglicéridos, otros terpenoides, ácidos grasos.

Cuadro 22. Rf de las muestras de extractos de callos de *T. globosa*, esteroides y estándares.

<b>Carril</b>	<b>Rf</b>	<b>Color</b>
1. Sitoesterol	0.65	Azul
2. Campesterol	0.55 y 0.65	Azul
3. Estigmasterol	0.55 y 0.65	Azul
4. Escualeno	0.82	Rojo vino
5. Fitol	0.76	Morado
6. Callo 1	0	Nulo
7. Callo 2	0	Nulo
8.10-diacetil baccatina	0.19	Café
9. Cefalomanina	0.48	Gris
10. Taxol	0.51	Gris

#### **4.7 Cultivo de células en suspensión de *Taxus globosa***

El aspecto físico inicial y coloración de los cultivos de células *in vitro* se observa en la Figura 26, según el tratamiento evaluado. Los cultivos celulares se les adicionó: 1) ácido naftalen acético, (NAA); 2) ácido naftalen acético y cinetina (NAA/CIN); 3) ácido naftalen acético y bencil amino purina (NAA/BAP); 4) ácido naftalen acético y picloram (NAA/PIC) y 5) picloram y polivinilpirrolidona (PIC/PVP). La formación de agregados celulares en los cultivos de células en suspensión es atribuida a la poca capacidad de separación de las células después de la división celular, aunado a la secreción de polisacáridos extracelulares que pueden ayudar a unir a las células. Sin embargo, la presencia de canales de citoplasma en las paredes celulares conocidos como plasmodesmatas sugieren que la comunicación intracelular puede ser un proceso importante en el sistema metabólico (Kieran *et al.*, 1997).

El aspecto físico inicial y final así como la coloración de los cultivos de células en suspensión de *T. globosa* es variable de acuerdo al regulador de crecimiento utilizado. El aspecto físico inicial y coloración de los cultivos de células *in vitro* se observa en la Figura 26. El aspecto físico inicial de las células con ácido naftalen acético (NAA) mostró un crecimiento regular con células de color verde pálido y algunas que comenzaban a oxidarse (Figura 26-1). El aspecto físico inicial de los cultivos en suspensión con la combinación de ácido naftalenacético con cinetina (NAA/CIN) se reflejó en un empardecimiento de las células (Figura 26-2) o un enrojecimiento de las células (Figura 26-2 siguiente) provocando la oxidación de las células y bajo crecimiento celular. Respecto a los cultivos crecidos con la combinación de ácido naftalenacético y bencil aminopurina (NAA/BAP) mostraron una mayor acumulación de células oxidadas. La combinación de ácido naftalenacético y picloram (NAA/PIC) favorecieron el crecimiento celular y la coloración de los agregados celulares formados fue de color amarillo pálido. Con la combinación de picloram y polivinilpirrolidona (PIC/PVP) se generó una suspensión de agregados celulares de color verde pálido. La polivinilpirrolidona (PVP) es un agente antioxidante utilizado en cultivos vegetales *in vitro* debido a que uno de los problemas más comunes en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es la emisión de sustancias fenólicas al medio de cultivo, la cual provoca afectaciones en el desarrollo del explante (Silva *et al.*, 1996).

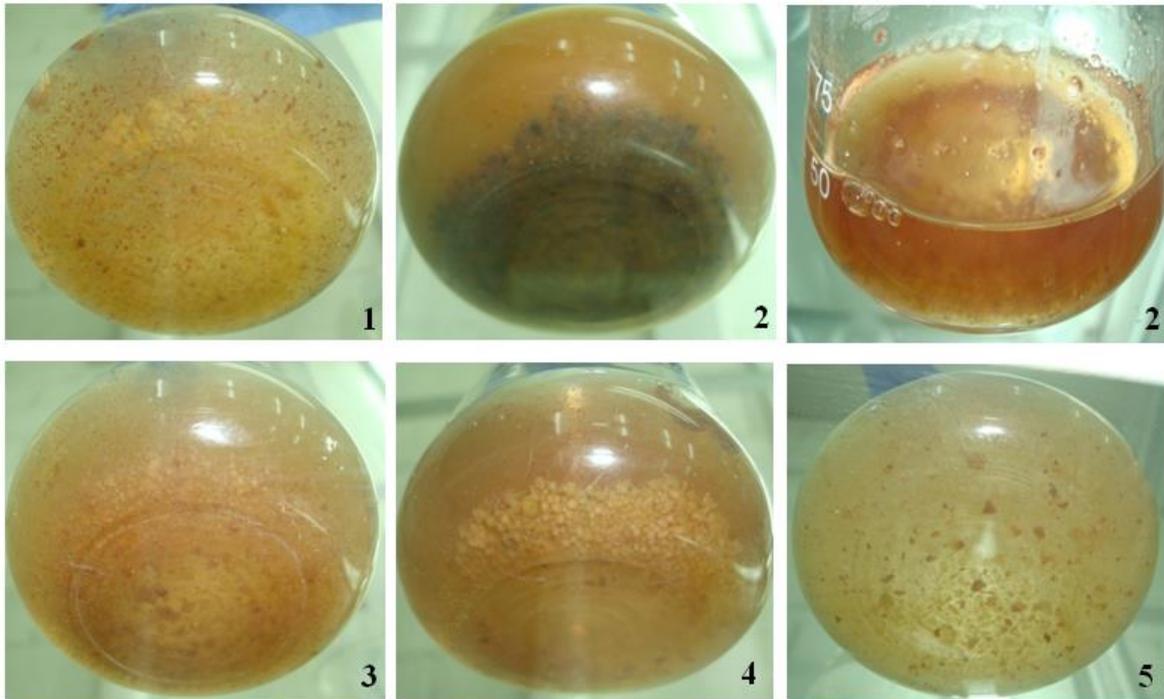


Figura 26. Aspecto físico de los inóculos iniciales en cultivos de células en suspensión de *T. globosa*. 1) NAA; 2) NAA/CIN; 3) NAA/BAP; 4) NAA/PIC y 5) PIC/PVP.

El aspecto físico final y coloración de los cultivos de células *in vitro* se observa en la Figura 27. El aspecto físico final de las células con ácido naftalen acético (NAA) a los 35 d después del cultivo (Figura 27-1) fue de una suspensión fina de color verde pálido, así como a los 14 d después del cultivo (Figura 1-a). El aspecto físico final de los cultivos en suspensión con la combinación de ácido naftalen acético y bencil amino purina (NAA/BAP) a los 21 d después del cultivo (Figura 3) evidencio la oxidación de las células, así como a los 14 d después del cultivo (Figura 3-a). Respecto a los cultivos crecidos con la combinación de ácido naftalen acético y picloram (NAA/PIC) a los 13 días del cultivo se muestra un óptimo crecimiento celular y color verde (Figura 4) y con la combinación de picloram y polivinilpirrolidona (PIC/PVP) a los 21 d después del cultivo genero una suspensión celular fina de color verde pálido. El cultivo de ácido naftalen acético y cinetina (NAA/CIN) se eliminó por la oxidación.

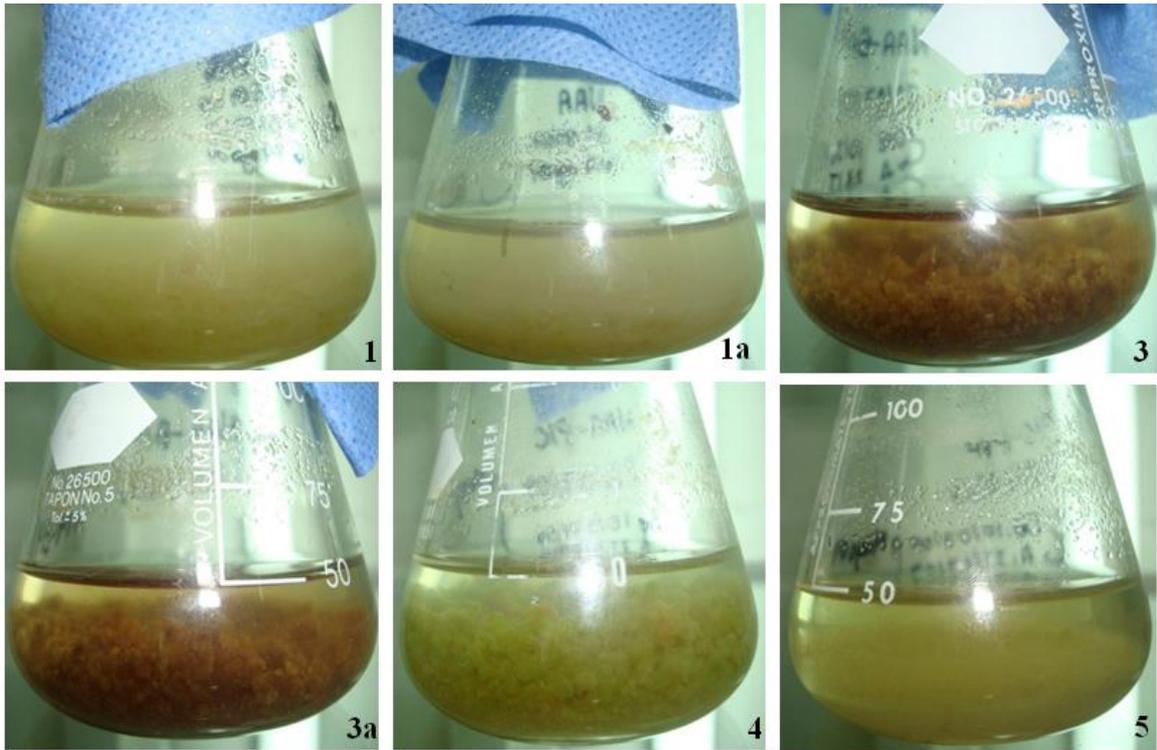


Figura 27. Aspecto físico final de los cultivos de células en suspensión de *T. globosa* a los días indicados después del cultivo. 1) NAA a los 35 d después del cultivo; 1a) NAA a los 14 d después del cultivo; 3) NAA/BAP a los 21 d después del cultivo; 3a) NAA/BAP a los 14 d después del cultivo; 4) NAA/PIC a los 13 días del cultivo y 5) PIC/PVP a los 21 d después del cultivo. Nota: el cultivo de NAA/CIN se eliminó por la oxidación.

El tratamiento utilizado para los experimentos de elicitación se conformó a partir de los cultivos de células en suspensión crecidos con la combinación de ácido naftalen acético y picloram (Figura 28).



Figura 28. Aspecto físico de los cultivos de células en suspensión de *T. globosa* con ácido naftalen acético y picloram utilizados en este trabajo.

Los patrones de formación de agregados varían dependiendo de la línea celular, la edad del cultivo y las condiciones de cultivo (Kieran *et al.*, 1997); por eso, cualquier cambio en los patrones de distribución de agregados puede indicar variaciones del cultivo como respuesta a factores ambientales. Por otro lado, la distribución de tamaño de los agregados juega un papel importante en el mezclado, nutrientes y transferencia de oxígeno, facilidad para la purificación de productos y con frecuencia está directamente relacionada con la productividad (McDonald *et al.*, 2001).

#### **4.8 Viabilidad celular en cultivos *in vitro* de células de *Taxus globosa***

Los resultados referentes a la viabilidad celular mostraron el efecto de las hormonas a nivel celular: en el medio adicionado con NAA/BAP las células de *Taxus* mostraron una proliferación celular dada por la bencil aminopurina que es una citocinina (Figura 29-a); en el tratamiento con las fitohormonas NAA/PIC las células mostraron una elongación y separación celular debido a que ambas son auxinas (Figura 29-b). En el tratamiento con NAA las células se mostraron alargadas y formando conjuntos (Figuras 29-c y la siguiente). La prueba de FDA mostró la fluorescencia de las células, lo que indicó que los cultivos celulares se mantuvieron viables a lo largo del tiempo del cultivo *in vitro*.

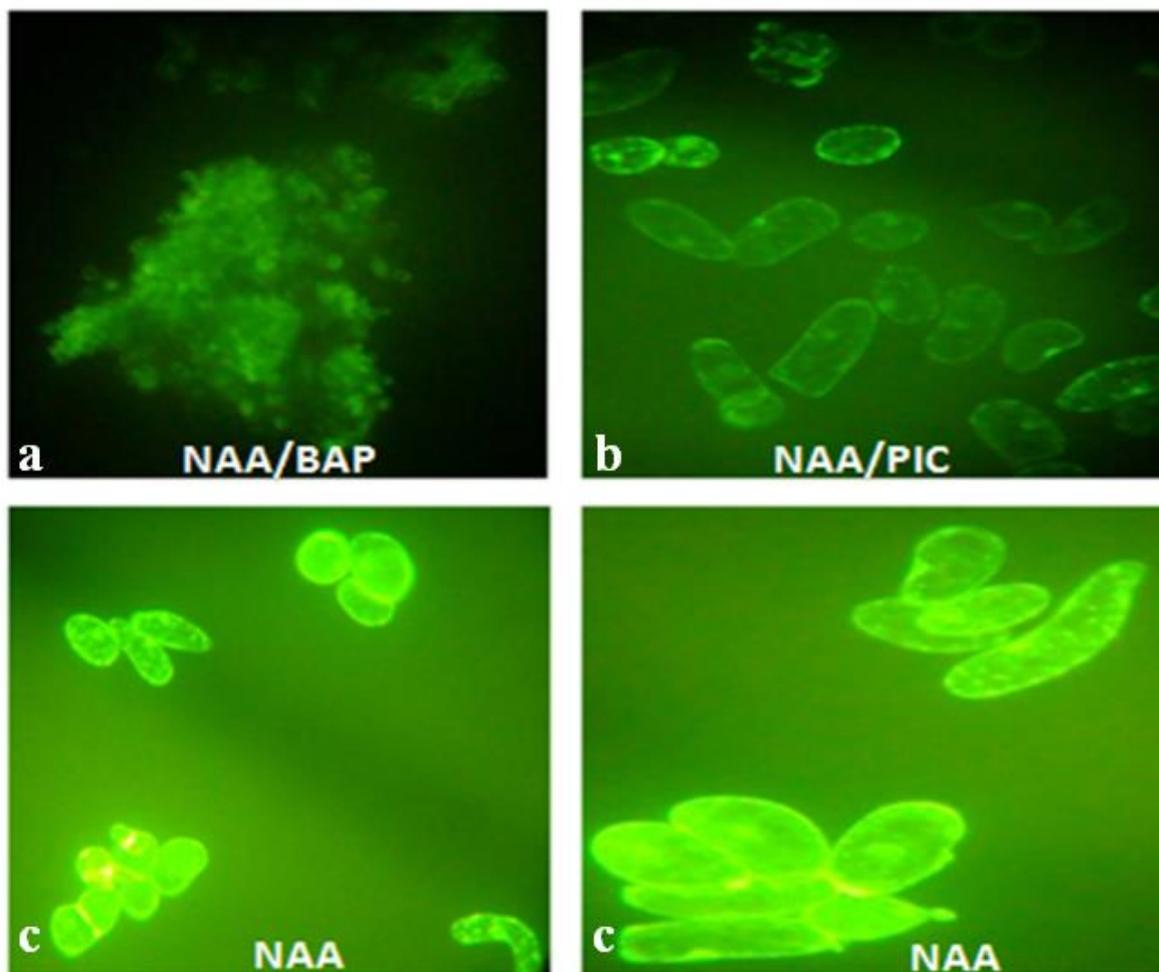


Figura 29. Células en medio B5 con: a) NAA (ácido naftalenacético)/BAP (Bencil amino purina; b) células en medio NAA (ácido naftalen acético/PIC (picloram) y c) células en medio NAA (ácido naftalen acético).

#### 4.9 Incremento de la producción de taxoides utilizando elicitación en cultivos de células en suspensión de *Taxus globosa*

En un estudio preliminar, se ensayaron en cultivos *in vitro*, el efecto de una combinación de dos elicitores: butionina de sulfoximina (BSO) y peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) sobre la producción de taxoides. Las células de *T. globosa* crecieron más rápido en medio de cultivo B5 de Gamborg con los reguladores de crecimiento ácido naftalenoacético y picloram. Durante el ciclo de crecimiento de las células, éstas mantuvieron más del 95% de la viabilidad celular. Cultivos de células de control produjeron 10-diacetil baccatina III (DAB)

2156, cefalomanina (CEF) 541,0 y taxol (TAX) 115.15  $\mu\text{g}$  por g de peso seco, los cuales se analizaron mediante cromatografía líquida. La elicitación con 0.2  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 0.8  $\mu\text{M}$  de BSO indujo 4.4 veces DAB III y 32.2 veces la producción de taxol mientras que la producción de cefalomanina se redujo por completo.

#### 4.9.1 Crecimiento celular

Los efectos de los elicitores: jasmonato de metilo, etanol y la combinación de butionina de sulfoximina y peróxido de hidrógeno en el peso seco de células en suspensión de *T. globosa* se muestran en la Figura 30.

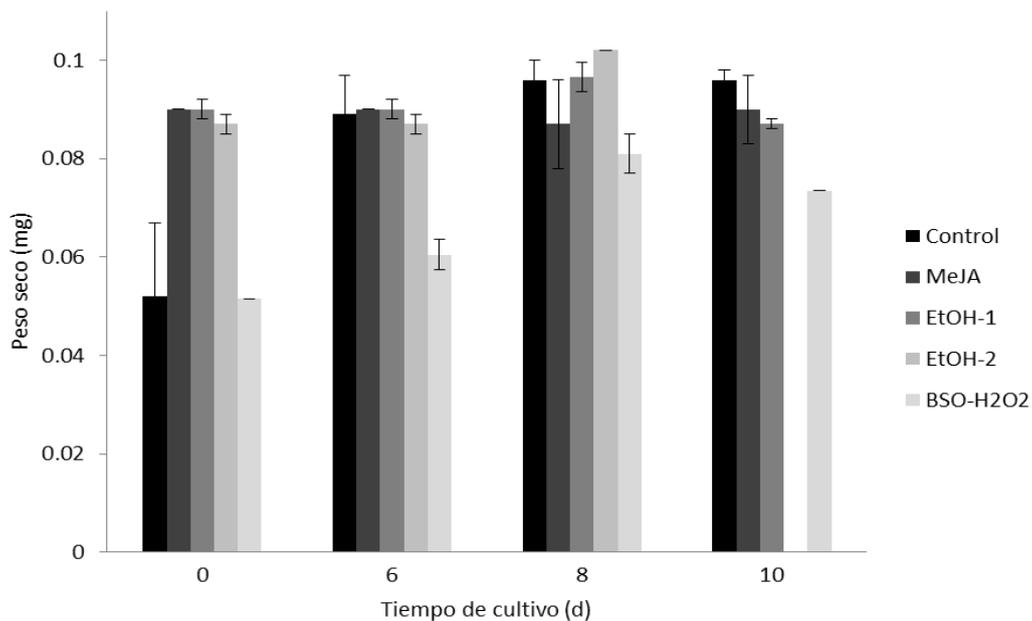


Figura 30. Peso seco (mg) de las células control y elicidadas con jasmonato de metilo, etanol-1, etanol-2 y la combinación de butionina de sulfoximina y peróxido de hidrógeno. Los datos son el promedio de 2 repeticiones. Barras indican la desviación estándar.

La ganancia máxima de biomasa seca (0.102 mg) se obtuvo con los tratamientos de butionina de sulfoximina y peróxido de hidrógeno, con pH de 5.5, en el octavo día después de la siembra. Con el elicitor de jasmonato de metilo se presentó el menor crecimiento en el octavo

día (0.087 mg). Las funciones biológicas del ácido libre y del metil éster es la inhibición del crecimiento y la promoción de la senescencia, respectivamente (Pauwels *et al.*, 2009). Los cultivos crecidos en medios de cultivo B5 con 13.4  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenacético NAA y 6.72  $\mu\text{M}$  de picloram, herbicida que es usado como sustituto de auxina, presentaron el mejor crecimiento y una coloración verde, es importante mencionar que las células en suspensión de *T. globosa* formaron agregados celulares. Edahiro y Ski (2006) mencionan que las células vegetales en suspensión tienden a formar agregados de manera natural ya que al dividirse no se separan adecuadamente, lo cual puede afectar la producción de metabolitos secundarios, probablemente debido al estrés nutricional, especialmente de oxígeno, que es causado por la limitación a la transferencia de masa en los agregados y por la diferenciación celular dentro de los mismos; además el aumento de las interacciones intercelulares puede facilitar el intercambio de señales y metabolitos, necesarios en la síntesis de algunos metabolitos particulares. Además, la cantidad de inóculo también puede afectar la formación de metabolitos en cultivos de células vegetales (Wang *et al.*, 1997). En cultivos en suspensión de *T. chinensis*, el tamaño de inóculo (1.5 a 6.0 g de peso seco  $\text{L}^{-1}$ ) afectó significativamente el crecimiento celular y acumulación de taxol intra y extracelular (Wang *et al.*, 1997). Por lo tanto, la cantidad de inóculo, el periodo de subcultivo, la intensidad de luz y el fotoperiodo, son factores decisivos para la multiplicación, apariencia fenotípica, producción de taxol y proliferación de células de *Taxus* spp. (Navia-Osorio *et al.*, 2002). Aunque la adición de un elicitor puede estimular la síntesis del metabolismo secundario, también puede causar inhibición del crecimiento y una rápida pérdida de la viabilidad celular. Diferentes autores como Yuan *et al.*, (2002a) y Qiao *et al.*, (2003) discuten respecto a la disminución de la viabilidad celular, proponen que se debe al efecto directo de los elicitores sobre las células o, a la alta acumulación de metabolitos secundarios, lo que podría ser tóxico para las células. En este sentido, se ha encontrado que los metabolitos secundarios involucrados en los

mecanismos de defensa inducen apoptosis (Solomon *et al.*, 1999; Knight *et al.*, 2001). Estudios llevados a cabo en *T. chinensis* revelaron que la formación del taxol está relacionada con la muerte celular (Ma *et al.*, 2002; Expósito *et al.*, 2009). Los valores obtenidos de las unidades pH así como del volumen de medio gastado se observan en las Figuras 2 y 3, respectivamente. La mayoría de los cultivos celulares se establecieron a un pH de 6.2. La Figura 31 muestra que las unidades de pH de los cultivos oscilaron en el rango de 5.2 a 6.2, se debe tener en cuenta que el mismo cambia durante el curso del cultivo y se destaca que son unidades pH eficientes para los cultivos en *T. globosa*.

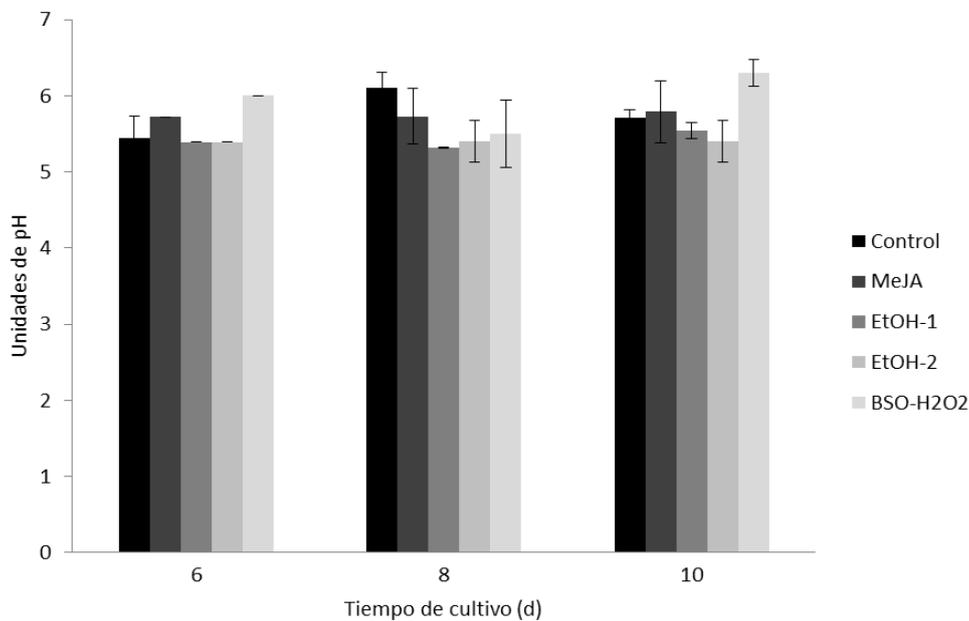


Figura 31. Determinación del pH en el medio de cultivo. Células control y elicidadas con jasmonato de metilo, etanol-1, etanol-2 y butionina de sulfoximina con peróxido de hidrógeno. Barras representan la desviación estándar.

Los cambios en el pH pueden afectar la producción de metabolitos, como se demuestra en la conversión de triptófano en triptofol, en donde la cantidad de producto a pH 6.3 constante es el doble que a pH variable y la síntesis se inhibe totalmente si el pH decae a 4.8 (Robert *et al.*, 1991).

Respecto al volumen de medio consumido, éste fue de consumo ascendente en el tratamiento con jasmonato de metilo, seguido del tratamiento con EtOH-2 (Figura 32).

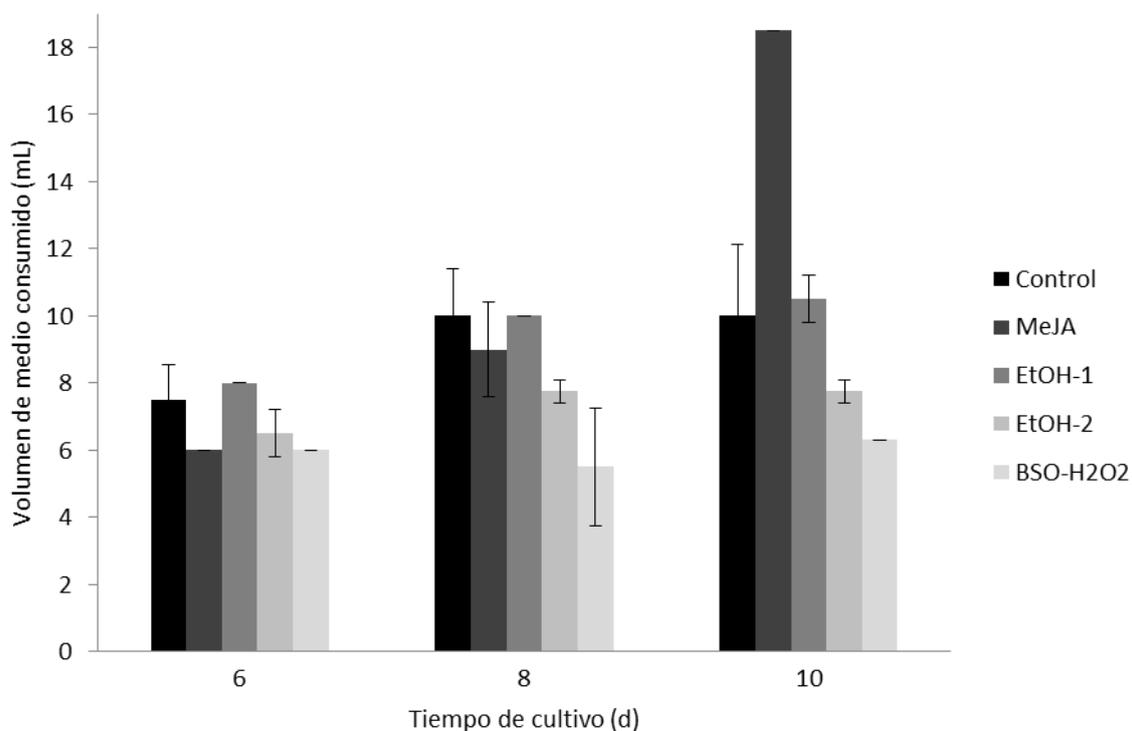


Figura 32. Determinación del volumen de medio consumido. Células control y elicidadas con jasmonato de metilo, etanol-1, etanol-2 y butionina de sulfoximina con peróxido de hidrógeno. Barras representan la desviación estándar.

#### 4.9.2 Producción de taxoides en cultivos de células de *Taxus globosa*

La elicitación consiste en inducir la biosíntesis de metabolitos por exposición de los cultivos a moléculas capaces de causarle una situación de estrés. Esta presencia determina la expresión de genes asociados con las enzimas catalizadoras de diferentes vías metabólicas (Roberts & Shuler, 1997). La Figura 33 muestra el efecto de los elicitores: jasmonato de metilo, etanol y la combinación de butionina de sulfoximina y peróxido de hidrógeno en respuesta al contenido del taxoide: 10-diacetil baccatina en células de *T. globosa*.

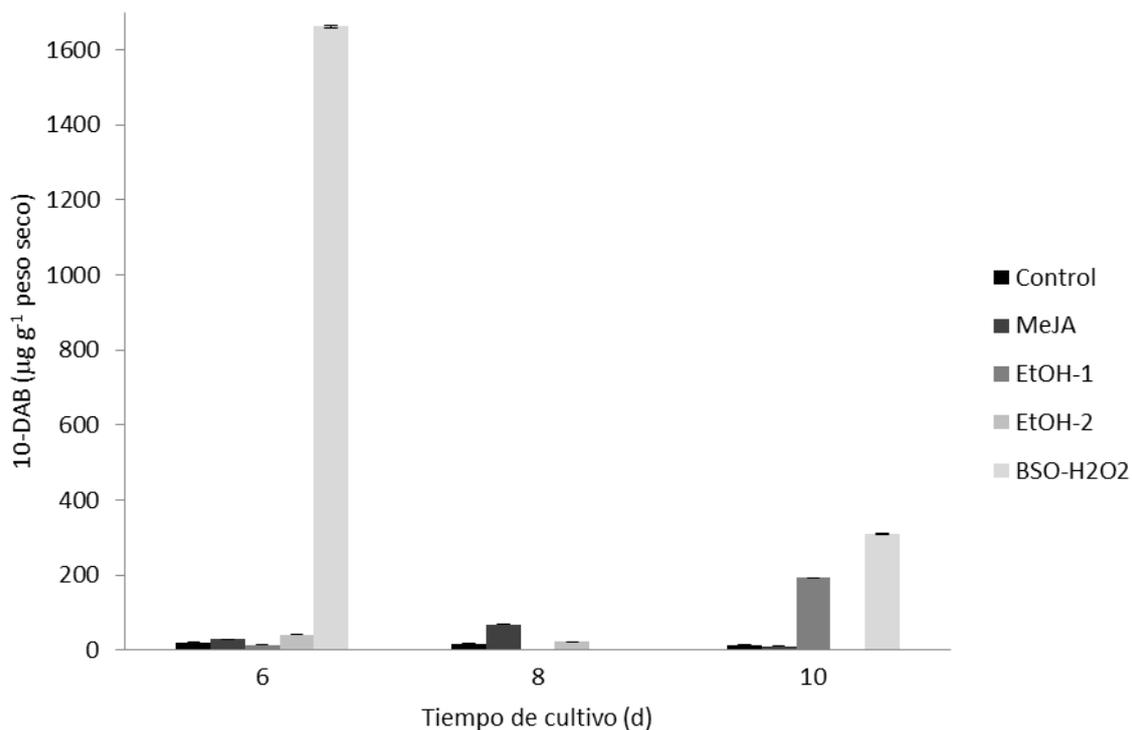


Figura 33. Efecto de la aplicación de los elicitores: jasmonato de metilo, etanol (EtOH) y la combinación de butionina de sulfoximina (BSO) y peróxido de hidrógeno (H2O2) en la producción de 10-diacetil baccatina, expresado como  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco, en cultivos de células de *Taxus globosa*. Los datos son el promedio de 2 repeticiones. Barras indican la desviación estándar.

La respuesta de elicitación con la combinación de butionina de sulfoximina y peróxido de hidrógeno registró la máxima cantidad de los taxoides. La mayor acumulación de 10-diacetil baccatina se registró en el sexto día con una producción de  $1,662.15 \mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco en las células elicidadas con la combinación de BSO y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a un pH de 6.0, por lo que se incrementó 80.7 veces el contenido de 10-DAB con respecto al control en el sexto día. En el día 10 se incrementó 21.66 veces el contenido de 10-DAB con respecto al control, a pH 6.3 (Cuadro 23). En el octavo día no se registró acumulación de 10-DAB.

Cuadro 23. 10-DAB acumulada en cultivos de células en suspensión de *T. globosa* control y elicitados.

Elicitor	10-DAB ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)
MeJA	10.78
EtOH-1	193.5
EtOH-2	0
BSO-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	309.12
Control	13.64

El jasmonato de metilo incrementó 2.85 veces la cantidad de 10-DAB con respecto al control en el octavo día a un pH de 5.73. Barradas *et al.*, (2010), en una línea celular de *T. globosa*, utilizando 1  $\mu\text{M}$  de jasmonato de metilo como elicitor, mostró a los 10 d una producción de 6.45  $\text{mg L}^{-1}$  de baccatina III; con una producción de biomasa de 6.85  $\text{g L}^{-1}$  con la concentración de 10  $\mu\text{M}$  del elicitor e indicando que estas líneas celulares utilizadas no contenían taxol ni 10-DAB. La concentración de etanol-uno incrementó 13.19 veces el contenido de 10-DAB en el día 10 con respecto al control a un pH de 5.54. Finalmente la concentración de etanol-dos incrementó 1.04 veces el contenido de 10-DAB en el día 10 con respecto al control a un pH de 5.4. El etanol induce la expresión de genes en el crecimiento y el desarrollo vegetal (Deveaux *et al.*, 2003) en *Arabidopsis thaliana* (Roslan *et al.*, 2001). En el trabajo de Kang *et al.*, (2011), durante la senescencia en hojas de arroz, se detectaron triptófano y metabolitos secundarios derivados del triptófano tales como la serotonina y 4-coumaroilserotonina con actividad antifúngica y antioxidante, respectivamente, se acumularon debido al metanol, se menciona que ningún solvente utilizado como el etanol, acetaldehído, isopropanol, formaldehído o ácido fórmico mostró la inducción de derivados de serotonina como el metanol (Kang *et al.*, 2011). Por lo que la inducción de la síntesis de estos derivados de serotonina bajo el tratamiento de elicitación con metanol fue cercanamente

relacionada y asociada con el incremento transitorio en la actividad de la enzima clave de la serotonina y derivados de serotonina fenólica-CoA, lo que sugirió un rol clave del metanol como un elicitador endógeno para el incremento de la biosíntesis de metabolitos primarios como el triptófano y secundarios; así como la inducción de varios factores de transcripción como los de la familia WRKY que mostraron patrones de inducción significativos, de los cuales WRKY14 juega un rol regulatorio clave en la biosíntesis del triptófano y de metabolitos secundarios derivados del triptófano. Por tanto, la aplicación de etanol exógeno en las células de *T. globosa* podría estar ayudando a la formación de la biosíntesis del aminoácido fenilalanina para que se exprese la enzima aminomutasa mediante una fenilalanoil Co-A, dando con 100  $\mu$ L de etanol una mayor concentración del taxoide 10-diacetilbaccatina III.

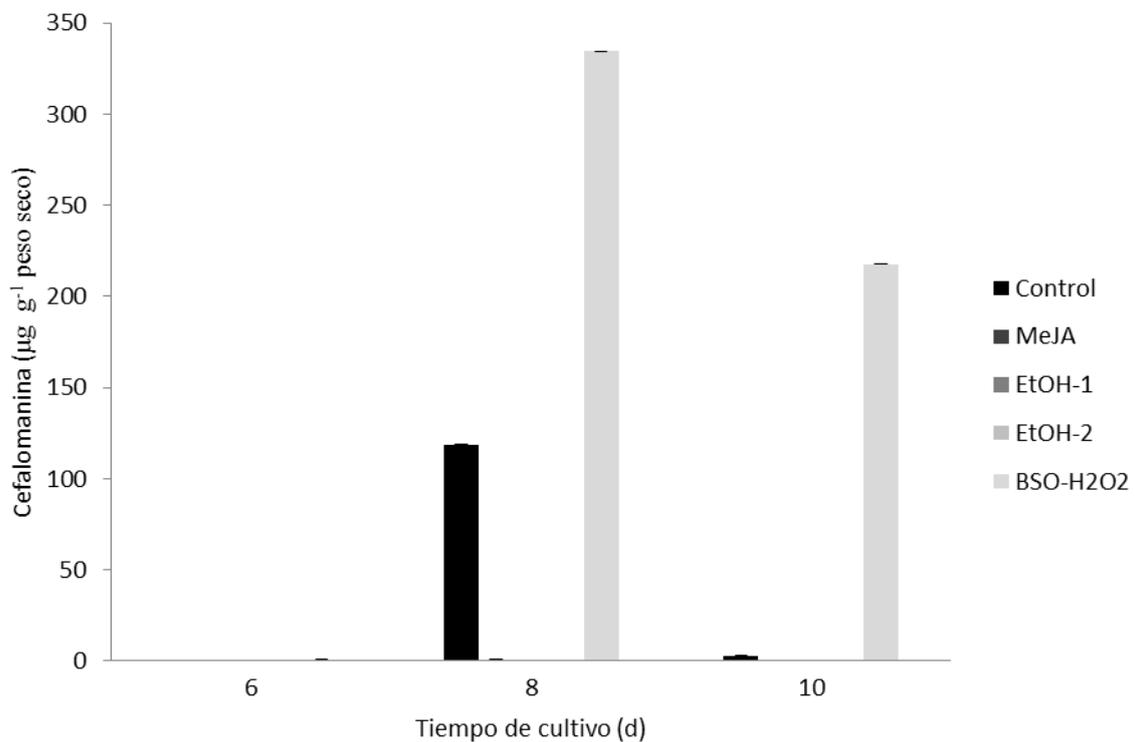


Figura 34. Efecto de la aplicación de los elicitores: jasmonato de metilo, etanol (EtOH) y la combinación de butionina de sulfoximina (BSO) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en la producción de cefalomanina, expresado como  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco, en cultivos de células de *Taxus globosa*. Los datos son el promedio de 2 repeticiones. Barras indican la desviación estándar.

El mayor contenido del taxoide cefalomanina se detectó en el octavo día en las células elicidadas con BSO y peróxido de hidrógeno a un pH de 5.5 con una producción de 334.32  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco, por lo que se incrementó 1.82 veces respecto al control (Figura 34). En el día 10 hubo una acumulación de 217.69  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco en el mismo tratamiento a un pH de 6.3, por lo que el incremento fue de 78.74 veces respecto al control (Cuadro 24). Con los demás elicitores no hubo incremento de cefalomanina (Figura 34). Aunque la cefalomanina tiene menor actividad anticáncer que el taxol, éste se puede utilizar como material de inicio para la semi-síntesis del taxol (Lan *et al.*, 2002). En otras especies de *Taxus*, Lan *et al.*, (2002), en cultivos de células de *T. chinensis* adicionaron 100  $\mu\text{M}$  de jasmonato de metilo y el rendimiento obtenido fue de 17  $\text{mg L}^{-1}$  de cefalomanina. El contenido de cefalomanina en cultivo de células de *T. baccata* elicidadas con 100  $\mu\text{M}$  de jasmonato de metilo fue de 3.6  $\text{mg L}^{-1}$  (Yukimune *et al.*, 1996; Malik *et al.*, 2011).

Cuadro 24. Cefalomanina acumulada en cultivos de células en suspensión de *T. globosa* control y elicidados.

Elicitor	Cefalomanina ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)
MeJA	0.417
EtOH-1	0
EtOH-2	0
BSO-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	217.69
Control	2.73

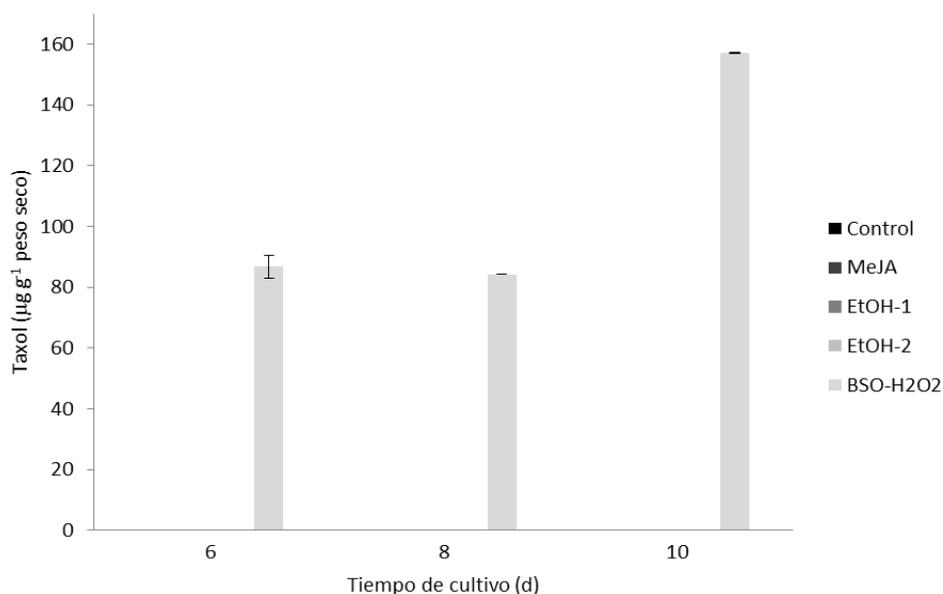


Figura 35. Efecto de la aplicación de los elicitores: jasmonato de metilo, etanol (EtOH) y la combinación de butionina de sulfoximina (BSO) con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en la producción de taxol de células de *Taxus globosa*. Los datos son el promedio de 2 repeticiones. Barras indican la desviación estándar.

La elicitación con la combinación de butionina de sulfoximina y peróxido de hidrógeno en la producción del taxol fue de 86.78, 84.2 y 157.0  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco en el sexto, octavo y décimo día respectivamente, en unidades pH de 6.0, 5.5 y 6.3 (Figura 35, Cuadro 25).

Cuadro 25. Taxol acumulado en cultivos de células en suspensión de *T. globosa* control y elicitados.

Elicitor	Taxol ( $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)
MeJA	0
EtOH-1	0
EtOH-2	0
BSO- $H_2O_2$	157
Control	0.0005

Algunos estudios indican que el estrés oxidativo (en particular la acumulación de  $H_2O_2$  intracelular y extracelular) podría ser un factor que promueva la biosíntesis del taxol y otros taxoides relacionados. Xu *et al.* (2005), mostraron que células de *T. cuspidata* responden al ácido oleico con una explosión oxidativa tanto para la producción de peróxido de hidrógeno intracelular como para la producción de oxígeno superóxido extracelular ( $O_2^-$ ). El incremento de la producción de los taxoides por elicitación es generalmente acompañado por un estallido oxidativo (Yu *et al.*, 2002), que es el aumento transitorio en la producción de especies reactivas de oxígeno ocurriendo en un número de interacciones planta-patógeno. El peróxido de hidrógeno juega un papel importante en la activación de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) y en la acumulación de compuestos fenólicos. Varios grupos de investigación han demostrado que la expresión de un número considerable de genes, se regula por el peróxido de hidrógeno (Rady y Nazif, 2005). En cultivos de suspensión de *Arabidopsis thaliana*, el peróxido de hidrógeno indujo la expresión de genes que codifican para la glutatión-S-transferasa, fenilalanina amonio liasa (Rady y Nazif, 2005). La biosíntesis de la cadena lateral de N-benzoil fenilisoerinoil del taxol comienza con la conversión de 2S- $\alpha$ -fenilalanina a 3R- $\beta$ -fenilalanina por la fenilalanina aminomutasa (Walker *et al.*, 2004). Los taxoides son compuestos polihidroxiados, por lo que el  $H_2O_2$  ha sido utilizado en reacciones de biosíntesis que involucran peroxidases en reacciones de hidroxilación y halogenación en orgánulos como los peroxisomas (Foyer *et al.*, 1994). Por lo tanto, el  $H_2O_2$  funciona como segundo mensajero y como señal difusible que activa genes relacionados con defensa (Lee *et al.*, 2001), además, de que el  $H_2O_2$  induce producción de ácido salicílico (AS), y que éste a su vez afecta a todas las enzimas antioxidantes (Knorzer *et al.*, 1999). La respuesta inicial a  $H_2O_2$  puede a la vez reducir y/o amplificar la señal oxidativa, permitiendo clasificar o tener una respuesta controlada a varios eventos particulares de elicitación (Suzuki y Mittler, 2006).

Vera *et al.*, (2013), estudiaron en cultivos de raíces de *Uncaria tomentosa* la producción de los alcaloides monoterpénicos oxindólicos: 3 $\alpha$ -dihidrocadambina y dolicanosido, los cuales fueron estimulados mediante la elicitación con peróxido de hidrógeno (0.2 mM), alcanzando niveles de 886.4, 847.7 y 87.5 mg.g de peso seco, en el día 8, y fue 1.7, 2.1, y 2.3 veces mayor con relación al control. Así mismo, en cultivos de raíces de *U. tomentosa* elicitados con una combinación de 0.8 mM de butionina de sulfoximina y 0.2 mM de ácido jasmónico (BSO-JA) produjeron dos veces más alcaloides que los cultivos tratados con peróxido de hidrógeno.

El glutatión es un metabolito antioxidante que protege a las células contra efectos de estrés desfavorables a través de la activación de varios mecanismos de defensa debido a su participación y mantenimiento del potencial de óxido-reducción en las células contra el estrés oxidativo. Además, toma parte en la remoción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en una reacción en la cual el grupo tiol de la cisteína en glutatión se oxida para formar GSSG. Por otra parte, la butionina de sulfoximina, BSO, (Fórmula molecular: C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, peso molecular: 222.305 g mol<sup>-1</sup>), es un aminoácido sintético que agota la fuente de glutatión en las células, y hace que sea un agente de la disminución e inhibición de la síntesis del glutatión intracelular. Este compuesto es un inhibidor irreversible de la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa que es una enzima clave requerida en el primer paso de la biosíntesis del glutatión. Bajo condiciones de no estrés, más del 90% del total del glutatión está en forma reducida (GSH) y de esta forma prevé la formación de puentes disulfuro intermoleculares, así, asegura la correcta construcción y apropiada actividad de las proteínas. Los altos niveles de GSH comparados con su forma oxidada (GSSG), es mantenida por la glutatión reductasa la cual regenera GSH de GSSG usando NADPH como agente reductor (Foyer *et al.*, 1994b), bajo condiciones de estrés, la relación de GSH y GSSG decrece, porque el GSH es usado para la reducción del exceso de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el ciclo glutatión ascorbato (Foyer y Noctor, 2000). La inhibición del glutatión induce el estrés oxidativo en los cultivos celulares de *T. globosa*, incrementando la producción de metabolitos secundarios, lo que favorece la biosíntesis de taxoides.

Los taxoides se aíslan a partir de callos, células en suspensión y del medio de cultivo celular (Expósito *et al.*, 2009), en esta investigación se aislaron a partir de células. La producción de taxol puede variar de 10 a 23.3  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco en callos de *Taxus* spp. (Wickremesinhe y Arteca 1993; Brunáková *et al.*, 2004), en callos de *T. globosa* la producción de taxol es de 26  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco de taxol (Barrios *et al.*, 2009), mientras que en el medio de cultivo de células en suspensión los rendimientos pueden variar de 0.008 a 110  $\text{mg L}^{-1}$  en cultivos celulares de *T. baccata* y *T. media*, respectivamente (Yukimune *et al.*, 1996; Vanek *et al.*, 1999). Respecto a los rendimientos de taxol en cultivos de células en suspensión de *T. baccata* sin elicitación son: 1.02  $\text{mg L}^{-1}$  (Khosroushahi *et al.*, 2006), 0.008  $\text{mg L}^{-1}$  (Vanek *et al.*, 1999) y 1.54  $\text{mg L}^{-1}$  (Srinivasan *et al.*, 1995). Los rendimientos de taxol con elicitación de jasmonato de metilo ha sido de 48.3  $\text{mg L}^{-1}$  (Yukimune *et al.*, 1996). En *T. cuspidata* el rendimiento sin elicitación es de 0.30  $\text{mg L}^{-1}$  (Roberts *et al.*, 2003). En células en suspensión de *T. canadensis* sin elicitación el rendimiento fue de 0.05  $\text{mg L}^{-1}$  (Linden and Phisalaphong, 2000) y con elicitación con jasmonato de metilo fue de 0.34  $\text{mg L}^{-1}$  (Linden and Phisalaphong, 2000). En cultivos en suspensión de *T. media* con elicitación con jasmonato de metilo se obtuvo un rendimiento de 110  $\text{mg L}^{-1}$  (Yukimune *et al.*, 1996). Existe un alto grado de variación de algunos genes implicados en la biosíntesis del taxol en poblaciones naturales del tejo de la Península Ibérica, lo que indica que algunos genes varían dentro de una misma población y también entre las diferentes poblaciones (Burgarella *et al.*, 2012). Parte de la variación detectada es fruto de las presiones ambientales particulares de cada bosque de *Taxus*, así que es posible que existan nuevas variantes moleculares de los genes implicados en la producción

de taxol en las diferentes poblaciones mundiales de tejo (Burgarella *et al.*, 2012). En cultivos de células de 14 d de edad *T. x media cv. Hicksii* se usó una extracción de pentano para buscar intermediarios en la biosíntesis de taxol, bloqueando pasos tardíos para poder acumular precursores prematuros y después de la cosecha, éstas células produjeron  $5.1 \mu\text{g g}^{-1}$  de peso fresco de taxol, una contribución de 0.55 mg de taxol en el cultivo entero (Ketchum y Croteau, 2006). Además, Kim *et al.*, (2005) señalan que, después del tratamiento con jasmonato de metilo, la pérdida de viabilidad celular parece relacionarse con un alto nivel de taxol y otros taxoides, en lugar del efecto propicio del jasmonato de metilo. Yuan *et al.*, (2002b), comprobaron que la adición de taxol en cultivos en suspensión de *T. cuspidata* altera la expresión genética y se induce apoptosis celular. Ketchum y Croteau (2006), indicaron que la cantidad de taxol en células de extractos metanólicos de *T. x media cv. Hicksii* obtenidas después de 2 semanas de subcultivo fue de  $42.6 \mu\text{g g}^{-1}$  de peso fresco sin elicitar. Además, mencionan que el contenido de taxol en células es cerca del 30 a 35%, mientras que del 65 a 70% de taxol se libera en el medio de cultivo, y que sólo cerca del 6% de taxa-4,11-dieno producido se transforma en taxol, mientras que el 84% comprenden a otros taxoides que se consideran como productos finales o de rutas laterales en la biosíntesis. La enzima taxadieno sintasa es la enzima responsable que origina la ciclización del geranilgeranildifosfato a taxa-4,11-dieno siendo un paso lento en la biosíntesis del taxol. Esta enzima es sin embargo, suficientemente activa para promover la formación de altos niveles (85%) de otros taxoides en cultivos celulares. La redirección genética de la ruta hacia la formación del taxol, y lejos de rutas alternativas para otros taxoides, puede ser la manera más eficiente de incrementar los rendimientos de taxol (Hung *et al.*, 2005; Ketchum y Croteau, 2006). Resultados obtenidos por otros investigadores (Holden *et al.*, 1988) corroboran el hecho de que la respuesta de los cultivos celulares con la elicitación puede variar debido a los diferentes estados del ciclo de crecimiento, edad y cantidad del inóculo. Abbasi *et al.* (2012) probaron cuatro diferentes

medios de cultivo (WPM, B5, MS y SH), concluyendo que el medio de cultivo no solo afecta el rendimiento del taxol sino que también afecta significativamente las cantidades de taxol secretado por las células.

Los Cuadros 26, 27 y 28 muestran los respectivos promedios de la producción de los taxoides junto con las desviaciones estándar.

Cuadro 26. Promedios de la producción del taxoide 10 diacetil baccatina y desviaciones estándar.

10 DAB					
TRAT	1	2	3	4	5
Tiempo					
1	20/8±	29/41±	13/6±	41/58±	1665/100±
2	17/25±	69/25±	0/0±	27/25 ±	0/0±
3	13/5±	10/0±	179/76±	--	309/6±

1: control, 2: jasmonato, 3: etanol-1, 4: etanol-2, 5: peróxido de hidrógeno + butionina.

Promedio/desviación estándar.

Cuadro 27. Promedios de la producción del taxoide cefalomanina y desviaciones estándar.

Cefalomanina					
TRAT	1	2	3	4	5
Tiempo					
1	0/0±	0/0±	0/0±	0/0±	0/0±
2	0/0±	0.7/1±	0/0±	0/0±	334/17±
3	2/3±	0.4/0.5±	0/0±	--	217/2±

1: control, 2: jasmonato, 3: etanol-1, 4: etanol-2, 5: peróxido de hidrógeno + butionina.

Promedio/desviación estándar.

Cuadro 28. Promedios de la producción del taxol y desviaciones estándar.

TRAT	Taxol				
	1	2	3	4	5
Tiempo					
1	0/0±	0/0±	0/0±	0/0±	87/32±
2	0/0±	0/0±	0/0±	0/0±	85/47±
3	0/0±	0/0±	0/0±	0/0±	157/53±

1: control, 2: jasmonato, 3: etanol-1, 4: etanol-2, 5: peróxido de hidrógeno + butionina.

Promedio/desviación estándar.

Existe efecto de tratamientos (Cuadro 29), siendo el tratamiento con peróxido de hidrógeno y butionina de sulfoximina de 110.15 y el resto cero. No existe efecto de tiempo, no hay interacción entre tratamientos\*tiempo.

Cuadro 29. Medias ajustadas de los tratamientos.

Tratamientos	Medias ajustadas	
BSO-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	110.15	a
Jasmonato	0	b
Etanol-1	0	b
Etanol-2	0	b
Control	0	b

**Ajuste de la estructura de covarianzas, mediante modelos mixtos.** Los modelos mixtos son los que incluyen tanto efectos fijos como efectos aleatorios. Mediante su uso es posible ajustar la estructura de covarianzas y estimar los errores estándar más adecuados para las diferentes comparaciones, acorde con las características de cada conjunto de datos.

**Estructura de covarianzas.** Existen numerosas opciones para modelar la estructura de covarianzas. Entre las que resultan más adecuadas son: 1) simétrica compuesta, 2) sin estructura y 3) autorregresiva de primer orden.

**Estructura simétrica compuesta.** Resulta adecuada cuando las lecturas en todos los tiempos tienen la misma varianza y todos los pares de medidas en la misma unidad experimental tienen la misma correlación. Ello implica que el único aspecto de la covarianza entre medidas repetidas es debido a la contribución común de la unidad experimental, sin importar la distancia en el tiempo.

**Modelación no estructurada.** En este caso se trabaja con una estructura abierta, sin realizar ningún supuesto sobre igualdad de varianzas o correlaciones. Esta alternativa tiene la desventaja de que no aprovecha las tendencias de varianzas y covarianzas en el tiempo, además de que a menudo se obtienen patrones erráticos de estimaciones de los errores estándar (Littell *et al.*, 1998).

**Estructura autorregresiva de primer orden.** Si existe una tendencia en las correlaciones de las observaciones dentro de cada unidad experimental, ésta puede ser modelada usando esta estructura. Esta estructura supone que la correlación dentro de las unidades experimentales es inversamente proporcional al espaciamiento en el tiempo.

### **Criterios de información.**

Las anteriores estructuras de covarianza pueden compararse objetivamente usando las pruebas de bondad de ajuste o criterios de información que se generan para cada estructura.

El criterio de selección consiste en escoger el modelo con el valor más bajo de AIC. (Gómez *et al.*, 2012), por lo tanto se eligió a la estructura matricial no estructurada (Cuadro 30).

Cuadro 30. Valores de los coeficientes del criterio de información de Akaike (AIC) y del criterio bayesiano de Schwarz (SBC) para las diferentes matrices de varianza-covarianza del error en la producción de tres taxoides.

Coeficiente	Estructuras matriciales de varianza-covarianza del error		
	Simétrica Compuesta	No estructurada	Autoregresiva de orden 1
AIC	433.5	427.5	434.1

En los tres tiempos hubo diferencias significativas ajustadas en los tiempos: tiempo 6= 87, tiempo 8= 85.39 y tiempo 10= 157.33. La diferencia entre BSO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el control es de 110.14, BSO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y jasmonato= 110.14; BSO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y EtOH-1: 110.15; BSO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y EtOH-2: 110.15. Hubo diferencias significativas entre tratamientos debido a las diferencias ajustadas con respecto al control, jasmonato, EtOH-1 y EtOH-2 con respecto al tratamiento de pebu en los tiempos 6, 8 y 10 (Cuadro 7). 87 a 157 es más grande en el tiempo 10 y es cuando se dispara las producciones de los taxoides con BSO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En promedio la diferencia es 110.14 (Cuadro 31).

Cuadro 31. Diferencias significativas ajustadas en tiempos mediante el modelo mixed.

	BSO-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Control 1	Jasmonato	Etanol -1	Etanol- 2
Tiempo	110.15	110.14	110.15	110.15	110.15
6	87.72*	87.72*	87.72*	87.72*	87.72*
6	87.72*	87.72*	87.72*	87.72*	87.72*
6	87.72*	87.69*	87.69*	87.69*	87.69*
8	85.39*	85.39*	85.39*	85.39*	85.39*
8	85.39*	85.39*	85.39*	85.39*	85.39*
8	85.39*	85.39*	85.39*	85.39*	85.39*
10	157.33*	157.30*	157.30*	157.30*	157.30*
10	157.33*	157.30*	157.30*	157.30*	157.30*
10	157.33*	157.30*	157.30*	157.30*	157.30*

Esquema resumido de los pasos que deben seguirse para evaluar cualquier experimento que involucre medidas repetidas:

1. Generar el correspondiente paso DATA en SAS, con toda la información que se habrá de incluir en el modelo: variables respuesta y factores, tanto fijos como aleatorios.
2. Correr, para el conjunto de datos, los procedimientos MIXED para la evaluación de las tres estructuras de covarianzas sugeridas: a) simétrica compuesta, b) sin estructura y c) autorregresiva de primer orden. Es necesario generar un procedimiento MIXED para cada una de las estructuras.
3. Con base en el criterio de información bayesiano de Schwarz (BIC) o Akaike (AIC), elegir la estructura de covarianzas más adecuada para el conjunto de datos.
4. Evaluar el análisis de varianza correspondiente a la estructura escogida.
5. Realizar las comparaciones de medias que sean del caso, con base en los resultados del correspondiente análisis de varianza.

## CONCLUSIONES

1.- El mejor tratamiento de inducción de callos es mediante el uso de picloram más el agente antioxidante PVP.

2.- El contenido mayor de taxol se registró en el extracto metanólico del cultivo *in vitro* de callos con la adición de picloram más ácido naftalenacético y en el extracto crudo metanólico de hojas.

3.- Se identificó a 10-diacetil baccatina por HPTLC en extractos de hojas, en extractos de callos no se identificó a los taxoides debido a la oxidación de los callos.

4.- Los extractos de callos para la identificación de esteroides por cromatografía en capa fina (TLC) presentó baja resolución.

5.- La prueba de FDA reveló que 95% de las células fluorescen, indicando que los cultivos celulares se mantienen viables (a lo largo del tiempo del cultivo *in vitro*).

6.- La producción de taxoides en cultivos de células en suspensión de *Taxus globosa* varía de acuerdo a la naturaleza del elicitador adicionado al medio, pero también al estado de crecimiento del cultivo de las células. La inhibición del glutatión induce el estrés oxidativo en los cultivos celulares, incrementando la producción de metabolitos secundarios, lo que favorece la biosíntesis de taxoides.

## REVISIÓN DE LITERATURA

Abbasi K. A., Reza M.M. y Otroshy M. 2012. Investigation of the effects of basal medium type on the production of anti-cancer drug taxol from cell culture of *Taxus baccata* L. *Journal of Plant Biology*. 4(12):83-88.

Ali M.B., Hahn E.J., Peak K.Y. 2006a. Cooper induced changes in the growth, oxidative metabolism, and saponin production in suspension culture roots of *Panax ginseng* in bioreactors. *Plant Cell. Rep.* 25: 1122-1132.

Ali M.B., Singh N., Shohael A.M., Hahn E.J., Peak K.Y. 2006b. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to cooper stress. *Plant Sci.* 171: 147-154.

Ali M.B., Hahn E. J., Paek K. Y. 2007. Methyl jasmonate and salicylic acid induce oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules*, 12: 607-621.

Ali M.B., Thanh N.T., Yu K.W., Hahn E.J., Peak K.Y. Lee H.L. 2005b. Induction in the antioxidant systems and lipid peroxidation in suspension culture roots of *Panax ginseng* induced by oxygen in bioreactors. *Plant Sci.* 169: 833-841.

American Cancer Society. 2013. *Cancer Facts and Figures*. Atlanta, Ga: American Cancer Society.

Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.

Azcón-Bieto J. y Talón M. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill, Interamericana. 2ª edición. 651 p.

Ballatori N, Krance S. M., Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond C. L. 2009. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390:191-214.

Barradas D.D.M., Hayward J.P.M., Mata R.M., Palmeros S.B., Platas B B.J., Velasquez T.R.F. 2010. *Taxus globosa* S. cell lines: initiation, selection and characterization in terms of growth, and of baccatin III and paclitaxel production. *Biocell.* 34(1):1-6.

Barrios H., Zhang Y., Sandoval C., Xiao Z. 2009. Increase of taxol production in *Taxus globosa* Shoot callus by Chlorocholine Chloride. *The Open Natural Products Journal.* 2: 33-37.

Brunakova K, Babincova Z, Takac M, Cellarova E. 2004. Selection of callus cultures of *Taxus baccata* L. as a potential source of paclitaxel production. *Eng Life Sci* 4:465-9.

Burgarella C., Navascués M., Zabal-Aguirre M., Berganzo E., Riba M., Mayol M., Vendramins G. G., y González-Martínez C. 2012. Recent population decline and selection shape diversity of taxol-related genes. *Molecular Ecology.* 21:3006-3021.

Camarena G.G. Octadecanoides como reguladores de la defensa de las plantas. Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. Vol. 8, núm. 2. pp. 107-112.

Castrejón S. M. 2007. Radicales libres y sistemas antioxidantes. En: Bioquímica: un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida. Editores: Díaz-Zagoya JC, Juárez- Oropeza MA. McGraw-Hill Interamericana, México. pp 611-628.

Centelles J. J., Imperial S., 2010. Paclitaxel: descubrimientos, propiedades y uso clínico. Fitoterapia. vol 29 núm 4.

Correa M.Y., Niño J., Mosquera M.O. 2006. Cuantificación de taxol y baccatin III en callos de *T. baccata* por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). *Scientia Et Technica*. 12 (32): 431-435.

Cragg G.M., Schepartz S.A., Suffness M., Grever M.R. 1993. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J. Nat. Prod.* 56: 1657-1759.

Creelman R.A., Mullet J.E. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:355-81.

Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales C, Piñol MT. 2002. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. *Biothechnol Prog* 18:418-423.

Cusido R.M., Palazon J. Bonfill M., Expósito O., Moyano E., Piñol M.T. 2007. Source of isopentenyl diphosphate for taxol and baccatin III biosynthesis in cell cultures of *Taxus baccata*. *Biochemical Engineering Journal*. 33: 159-167.

Chawla, H.S. 2000. Introduction to plant biotechnology. Science publishing. Inc. Enfield (NH). USA.

Chong T. M., Abdullah M. A., Lai O. M., Nor'Aini F. M., Lajis N. H. 2005. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochemistry*. 40:3397-3405.

Davis P.A. (Eds.) Oxidants in Biology. Springer-Verlag. Pp 1-17.

Desikan R., Hancock J.T., Coffey M.J., Neill S.J. 1996. Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS letters* 382: 213-217.

Díaz JF, Barasoain I, Souto AA, Amat-Guerri F, Andreu JM. 2005. Macromolecular accessibility of fluorescent taxoids bound at a paclitaxel binding site in the microtubule surface. *J Biol Chem* 280: 3928-3937.

Doares SH; Syrovets T.; Weiler EW; Ryan C.A. 1995. Oligogalacturonides and Chitosan Activate Plant Defensive Genes Through the Octadecanoid Pathway. *PNAS* 92: 4095- 4098.

Dong H.D, Zhong J.J. 2002. Enhanced taxane productivity in bioreactor cultivation of *Taxus chinensis* by combining elicitation, sucrose feeding and ethylene incorporation. *Enzyme Microb. Technol.* 31:116-121.

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. 2000. Glutathione metabolism in brain, metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267: 4912-4916.

Edahiro J.I., Ski M. 2006. Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 102 (1): 8-13.

Eisenreich W, Mewnhard B, Hylands PJ, Zenk MH, Bacher A. 1996. Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *PNAS* 93:6431-6436.

Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili MH, Cusidó RM, Palazón. 2009. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *J. Anticancer Agents Med Chem.* 9(1):109-21.

Exposito O., Bonfill M., Onrubia M., Jané A., Moyano E., Cusidó R.M., Palazón J., Piñol M.T. 2009. Effect of taxol feeding on paclitaxel and related taxane production in *Taxus baccata* suspension cultures. *New Biotech.* 25:252-259.

Forman H. J. 2008. Hydrogen peroxide: The good, the bad and the ugly in Valacchi G,

Foyer C.H., Lescure J.C., Lefebvre C., Morot-Gaudry J.F., Vincentz M., Vaucheret H. 1994b. Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase activity. *Plant Physiology* 104, 171–178.

Foyer CH, Noctor G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol* 146:359–388.

Franco R, Cidlowski JA. 2009. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16:1303-1314.

Franklin G., Oliveira M., Dias A. C. P. 2007. Production of transgenic *Hypericum perforatum* plants via particle bombardment-mediated transformation of novel organogenic cell suspension cultures. *Plant Science* 172: 1193-1203.

Gundlach H., Muller M.J., Kutchan T.M., Zenk M.H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 2389-2393.

Hahn M G. 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology.* Vol. 34 Issue 1, 387

Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. Free radicals in biology and medicine. Fourth Edition. Oxford University Press, New York, USA, p. 851.

Hansen R.C., Cochran K.D., Keener H.M., Croom E.M. 1994. *Taxus* populations and clippings yields at commercial nurseries. *J. Environ. Hort.* 15 (4): 200-205.

Heinig U, Jennewein S. 2009. Taxol: A complex diterpenoid natural product with an evolutionarily obscure origin. *African Journal of Biotechnology* 8(8):1370-1385.

Helson L. y Ainsworth SK. 1997. Inventors; NaPro BioTerapeutics. Inc., assignee. Method for assessing sensitivity of tumor cells to cephalomannine and 10-deacetyltaxol. U.S. Patent 5,688,517. 1997 nov. 18.

Hezari M, Lewis NG, Croteau R. 1995. Purification and characterization of taxa- 4(5),11(12)-diene synthase from pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of Taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 322, 437-444.

Holden, R.R., M.A. Holden, y M.M. Yeoman. 1988. The effects of fungal elicitation on secondary metabolism in cell cultures of *Capsicum frutescens*. In R.J. Robins and M.J.C. Rhodes (eds.), *Manipulating secondary metabolism in culture*, Cambridge University Press, pp. 67-72.

Hung Sh.H., Yu Ch.W., Lin Ch.H. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot Bull. Acad. Sin.* 46:1-10.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* <http://caonline.amcancersoc.org/cgi/content/abstract/caac.20073v1>

Jiménez J. C. A. 2005. Aplicación de la geometría fractal a agregados celulares de *Beta vulgaris* L. crecidos en suspensión (matraces y biorreactor tipo tanque agitado). Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Departamento de biotecnología. 82 p.

Kang K., Park S., Natsagdorj U., Kim Y.S., Back K. 2011. Methanol is an endogenous elicitor molecule for the synthesis of tryptophan and tryptophan-derived secondary metabolites upon senescence of detached rice leaves. *The Plant Journal.* 66:247-257.

Ketchum REB, Croteau RB. 2006. The *Taxus* metabolome and the elucidation of the Taxol biosynthetic pathway in cell suspension cultures. *Biotechnol. Agric. For.* 57: 291-309.

Kieran P. M., MacLoughlin P. F., Malone D. M. 1997. Plant cell suspension cultures:some engineering considerations. *Journal of Biotechnology.* 59: 39-52.

Kim, S. I., Choi, H. K., Kim, J. H., Lee, H. S., y Hong, S. S. 2001. Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Enzyme and Microbial Technology,* 28, 202–209.

- Kim B.J., Gibson D.M., Shuler M.L. 2005. Relationship of viability and apoptosis to taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures elicited with methyl jasmonate. *Biotechnol Prog* 21:700-707.
- Kim, B. J., Gibson, D. M., y Shuler, M. L. 2006. Effect of the plant peptide regulator, phytosulfokine-alpha, on the growth and taxol production from *Taxus* sp. suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 8–14.
- Khosroushahi, A. Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Kim, B. J., Gibson, D. M., y Shuler, M. L. 2006. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*, 30, 262–269.
- Knight V.I., Wang H., Lincoln J.E., Lulai E.C., Gilchrist D.G., Bostock R.M. 2001. Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts. *Physiol. Mol. Plant pathol.* 59: 277-286.
- Knorzer O. C., Leder B., Durner J. y Boger P. 1999. Antioxidative defense activation in soybean cells. *Physiol. Plant.* 107:294-302.
- Komaraiah P., Kishor P. B. K., Carlsson M., Magnusson K. E., Mandenius C. F. 2005. Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. *Plant Science.* 168: 1337–1344.
- Kwak J.M., Nguyen V., Schrieder J.I. 2006. The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol.* 141:323-29.
- Lakdawala A., Wang M., Nevins N., Liotta D. C., Rusinska-Roszak D., Lozynski M. y Snyder J. P. 2001. *BMC Chemical Biology*, 1:2. Calculated conformer energies for organic molecules with multiple polar functionalities are method dependent: Taxol (case study).
- Lan W. Z., Yu L. J., Cheng P., Li M. Y. 2002. Improvement of cephalomannine production in *Taxus chinensis* cells by a combination of sucrose and methyl jasmonate. *Biotech. Lett.* 24:1253-1255.
- Lee H., Lee J. S., Noh E. W., Bae E. K., Choi Y. I., Han M. S. 2005. Generation and analysis of expressed sequence tags from poplar (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*) suspension cells. *Plant Science.* 169: 1118–1124.
- Lee D. H., Kim Y. S., y Lee C. B. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 158:737-745.
- Lee M y Phillips R.L. 1988. The cromosomal basis of somaclonal variation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 39: 413-437.
- Li N., Karin M. 1999. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* 10:1137-43.
- Lichtenthaler H.K. 1998. Stress concept in plants. *Ann. NY. Acad Sci.* 851:187-198.
- Lindeng J.C., Phisalaphong M. 2000. Oligosaccharides potentiate methyl-jasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*. *Plant Sci.* 158:41-51.
- López G. G. 2001. Árboles y arbustos de la Península Ibérica. Ed. MundiPrensa. Madrid.

- Lucas H. 1856. Ueber in den blättern von *Taxus baccata* L. enthaltenes alkaloid (das taxin). *Arch. Pharm.* 85: 145-149.
- Llorente E.B. 2000. Aislamiento, purificación, caracterización y producción *in vitro* de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de la Plata. Facultad Ciencias Exactas. 201 p.
- Maheshwari P, Garg S, Kumar A. 2008. Taxoids: Biosynthesis and *in vitro* production. *Biotechnol Mol Biol Rev* 3(4):071-087.
- McDonald, K. J. y S. Hurst. 2001. Characterization of plant suspension cultures using the focused beam reflectance technique. *Biotechnology letters.* 23:317-324.
- McGuire W.P., Rowinsky E.K., Rosenshein N.B., Grumbine F.C., Ettinger D.S., Armstrong D.K. 1989. Taxol: a unique antineoplastic agent significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasmas. *Ann. Intern. Med.* 111: 273-279.
- Malik S., Cusido R.M., Mirjalili H.M., Moyano E., Palazon J., Bonfill M. 2011. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process biochemistry.* 46: 23-34.
- Martínez-Sámano J., Torres-Durán P. V., Juárez-Oropeza M. A. 2011. El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista de Educación Bioquímica.* 30(2): 56-67.
- McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL. 2005. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu Rev Nutr* 25: 261-295.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*7:405-410
- Memelink J. Gantet P. 2007. Transcription factors involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochem. Rev* 6: 353-362.
- Miyanağa, K., M. Seki y S. Furusaki. 2000b. quantitative determination of culture strawberry cell heterogeneity by image analysis: effects of medium modification on anthocyanin accumulation. *Biochemical Engineering Journal.* 5: 201-207.
- Morales L. E. 2008. Cultivos celulares de *Jacarantia mexicana* en tres tipos de biorreactores para la producción de enzimas proteolíticas. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. 69 p.
- Mroczek T., Glowniak K., y Hajnos M. 2000. Screening for pharmaceutically important taxoids in *Taxus baccata* var. Aurea corr. With CC/SPE/HPLC-PDA procedure. *Biomed. Chromatogr.* 14:516-529.
- Namdeo A. G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Phcog Rev.* 1: 69-79.

- Navia-Osorio, A., Garden, H., Cusido, R. M., Palazón, J., Alfermann, A. W., y Piñol, M. T. 2002. Taxol and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor. *Journal of Plant Physiology*, 159, 97–102.
- Neill S., Desikan R., Hancock J. 2002. Hydrogen peroxide signalling, *Current Opinion in Plant Biology*, 5:388-395.
- Nguyen T., Eshraghi J., Gonyea G., Ream R., y Smith R. 2001. Studies on factors influencing stability and recovery of paclitaxel from suspension media and cultures of *Taxus cuspidate* cv *Densiformis* by High-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 911: 55–61.
- Noctor G., Foyer C.H. 1998. Ascorbate, glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:249-279.
- Orozco-Cárdenas M.L., Narváez-Vásquez J., Ryan C.A. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant cell*. 13: 179-191.
- Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Mallol A, Moyano E, Morales C, Piñol MT. 2003. Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiol Biochem* 41:1019-1025.
- Park J.J., Yoon S.Y.H., Cho H.Y., Son S.Y., Rhee H.S., Park J.M. 2006. Patterns of protein expression upon adding sugar and elicitor to the cell culture of *Eschscholtzia californica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86:257-269.
- Pauwels L., Inzé D., Goznes A. 2009. Jasmonates-inducible gene: What does it mean? *Trends Plant Sci.* 14: 87-91.
- Qian Z.G., Zhao Z.J., Xu Y., Qian X., Zhong J.J. 2005. Highly efficient strategy for enhancing taxoid production by repeated elicitation with a newly synthesized jasmonate in fed-batch cultivation of *Taxus chinensis* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 90:516-521.
- Qiao J.J., Yuan Y.J., Zhao H., Wu J.C., Zeng A.P. 2003. Apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus cuspidata* co-treated with salicylic acid and hydrogen peroxide. *Biotechnol. Lett.* 25:387-390.
- Qin W. M., Lan W. Z., Yang X. 2004. Involvement of NADPH oxidase in hydrogen peroxide accumulation by *Aspergillus niger* elicitor-induced *Taxus chinensis* cell cultures. *Journal of Plant Physiology*. 161:355-361.
- Quan L.J., Zhang B., Shi W.W., Li H.Y. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.* 50:2-18.
- Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37: 91-102.
- Rady M.R., Nazif N.M. 2005. Rosmarinic acid content and RAPD analysis of *in vitro* regenerated basil (*Ocimum americanum*) plants. *Fitoterapia* 76(6):525-533.

- Rijhwani S.K, Shanks J.V. 1998. Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root culture. *Biotechnol. Prog.* 14:442-449.
- Robert M.L., Reyes J., Loyola V.M. 1991. Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*. *In: Cultivos de Tejidos en la Agricultura* (WM Roca & LA Mroginski, eds.), pp.: 211-238. CIAT. Cali. Colombia.
- Roberts S.C., Nail M., Gibson D.M., Shuler M.L. 2003. A simple method for enhancing paclitaxel release from *Taxus canadensis* cell suspension cultures utilizing cell wall digesting enzymes. *Plant Cell Rep.* 21 (12): 1217-1220.
- Roberts S.C., Shuler M.L. 1997. Large-scale cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 154-159.
- Roslan H.A., Salter M.G., Wood C.D., White M.R.H., Croft K.P., Robson F., Coupland G., Doonan J., Laufs P., Tomsett A.B., Caddick M.X. 2001. Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.* 28(2):225-235.
- Sánchez-Sampedro M. A., Fernández-Tárrago J., Corchete P. 2008. Some common signal transduction events are not necessary for the elicitor-induced accumulation of silymarin in cell cultures of *Silybum marianum*. *Journal of plant physiology.* **165**: 1466-1473.
- Sanz M. K., Hernandez X. E., Tonn C. E., Guerreiro E. 2000. Enhancement of tassaric acid production in *Tessaria absinthioides* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports.* **19**:821-824.
- Seki M., Ohzora C., Takeka M., Furusaki S. 1997. Taxol (paclitaxel) production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol. Bioeng.* 53: 214-219.
- Shi Q., Wang H.K., Bastow K.F. Tachibana Y., Chen K., Lee KH. 2001. Antitumor agents 210. Synthesis and evaluation of taxoid-epipodophyllotoxin conjugates as novel cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* 9:2999-3004.
- Shu-Tao L., Peng Z., Meng Z., Chun-Hua F., Chun-Fang Z., Yan-Shan D., An-Yuan G. y Long-Jiang Y. 2012. Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate. *BMC Genomics.* 13:295.
- Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E., Levine A. 1999. The involvement of cysteine protease and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell.* 11:431-443.
- Song J.I., Dumais M.R. 1991. From yew to us: the curious development of taxol. *Jama.* 266: 1281.
- Sparano JA, Wang M, Martino S, Jones V, Perez EA, Saphner T, Wolff AC, Sledge GW, Wood WC, Davidson NE. 2008. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 358(16):1663-1671.
- Srinivasan V., Pestchanker L., Moser S., Hirasuna T.J., Taticek R.A., Shuler M.L. 1995. Taxol production in bioreactors: kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake, and taxol production by cell suspensions of *Taxus baccata*. *Biotechnol. Bioeng.* 47:666-676.

- Subramaniam R, Despres C, Brisson NA. 1997. Functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. *Plant Cell* 9: 653–664.
- Suzuki N, Mittler R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.* 126, 45-51.
- Szabados L, Mroginski L y Roca WM. 1991. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. En: *Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones* (WM Roca & LA Mroginski, eds.), pp.: 173-210.
- Tang Z., Yang L., Zu Y., Guo X. 2009. Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Growth Regul.* 57:15-20.
- Uriarte B. V. y Trejo F. C. S. 2003. *Farmacología clínica*. Mexico. Edit. Trillas. pp. 599-601.
- Uwe Heinig y Stefan Jennewein. 2009. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (8), pp. 1370-1385.
- Van Breusegem F., Dat J. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant. Physiol.* 141:384-90.
- Van der Fits L; Memelink J. 2000b. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289:295-297.
- Vanek T., Malá J., Saman D., Silhavá I. 1999. Production of taxanes in bioreactor by *Taxus baccata* cell. *Planta Med* 65:275-276.
- Velasco S.A., Lorenzo A., Serrano P. 1993. *Farmacología Velázquez*. Editorial: Interamericana - McGraw-Hill med. 16ª edición: ISBN:978-84-7615-958-3.
- Vera-Reyes I, Huerta-Heredia A.A., Ponce-Noyola T., Flores-Sánchez I.J., Esparza García F., Cerda-García-Rojas C.M., Trejo-Tapia G., Ramos-Valdivia A.C. 2013. Strictosidine-related enzymes involved in the alkaloid biosynthesis of *Uncaria tomentosa* root cultures grown under oxidative stress. *Biotechnology Progress*. 29(3): 621-630.
- Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53(372):1227-36.
- Walker K, Long R, Croteau R. 2002. The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *PNAS* 99:9166-9171.
- Walker K. D., Klettke K., Akiyama T., y Croteau R. 2004. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in taxol biosynthesis. *J Biol Chem.* 279:53947–53954.
- Wang W., Zhang Z. Z., Zhong J.J. 2005. Enhancement of ginsenoside biosynthesis in high-density cultivation of *Panax notoginseng* cells by various strategies of methyl jasmonate elicitation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67: 752-758.

- Wang Z. Y., Zhong J.J. 2002. Repeated elicitation enhances taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors. *Biotechnology Letters*. **24**: 445-448.
- Wang H. Q., Zhong J. J., y Yu J. T. 1997. Enhanced production of taxol in suspension cultures of *Taxus chinensis* by controlling inoculum size. *Biotechnology Letters*. 19(4):353-355.
- Wani M.C., Taylor H.L., Wall M.E., Coggon P., McPhail A.T. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. American. Chem. Soc.* 93: 2325-2327.
- Wasternack C., Hause B. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and plant development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **72**: 165–221.
- Wickremesinhe R. M. E., Arteca N. R. 1993. Methodology for the identification and purification of taxol and cephalomannine from *Taxus* callus cultures. *Journal of Liquid Chromatography*. 16: 3263-3274.
- Wildung MR, Croteau R. 1996. A cDNA clone for taxadiene synthase that catalyzes the committed step of Taxol biosynthesis. *J Biol Chem* 271, 9201-9204.
- Xu M., Dong J. 2005. O<sub>2</sub><sup>-</sup> from elicitor induced oxidative burst is necessary for triggering phenylalanine ammonia-lyase activation and catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* cell culture. *Enzyme Microb. Technol.* 36:280-284.
- Xu Q. M., Cheng J. S., Ge Z. Q., y Yuan Y. J. 2005. Antioxidant responses to oleic acid in two-liquid-phase suspension cultures of *Taxus cuspidata*. *Appl Biochem Biotechnol* **125**: 11–26.
- Ying-Jin Y., Chun L., Jin-Chuan W. y Zong-Ding H. 2002. A model for signal transduction in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by an oligosaccharide from *Fusarium oxysporum* *Biotechnology Letters* 24: 407–412.
- Yu L. J., Lan W. Z., Qin W. M., Jin W. W., Xu H. B. 2002. Oxidative stress and taxol production induced by fungal elicitor in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biologia Plantarum* 45: 459-461.
- Yuan Y.J., Li C., Hu Z.D., Wu J.C. 2002. A double oxidative burst for taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxysprum*. *Enzyme Microb. Technol.* 30:774-778.
- Yuan Y.J., Ma Z.Y. y Wu J.Ch. 2002b. Isolation of differential genes in suspension cultures of *Taxus cuspidata* induced by additional taxol. *Molecular Biotechnology*. 20:137-143.
- Yukimune Y. Tabata H., Higashi Y., Hara Y. 1996. Methyl jasmonate induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biothechnol.* 14:1129-1132.

Zhao J., Davis L.C., Verpoorte R. 2005a. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23: 283–333

Zhao J., Verpoorte R. 2007. Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in reactors: from biochemical processing to metabolic engineering. *Phytochem Rev.* 6:435-457.

Zhong J. J., 2001. Biochemical Engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures in. Scheper T. (EdS) *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Vol. 72. Plant cells.

## APÉNDICE

### **A-1 Preparación del reactivo de anisaldehído**

Se mezcla en un baño de hielo 9 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 85 mL de metanol, 10 mL de ácido acético y 0.5 mL de anisaldehído.