

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



Casa abierta al tiempo

**Producción de taxol y taxanos relacionados en cultivos de células  
en suspensión de *Taxus globosa* (Schltdl)**

**TESIS**

Para obtener el grado de Doctor en Biotecnología

**PRESENTA**

M. C. Nadia Primavera Tapia Barrera

**Director**

Dr. Francisco Cruz Sosa

**Co-Directora**

Dra. Lidia Teresa Osuna Torres

Diciembre 2014



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00146

Matrícula: 210380797

PRODUCCION DE TAXOL Y  
TAXANOS RELACIONADOS EN  
CULTIVOS DE CELULAS EN  
SUSPENSIÓN DE TAXUS GLOBOSA  
(Schltdl)

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 18 del mes de diciembre del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ  
DRA. MARIA DEL PILAR NICASIO TORRES  
DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO  
DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: NADIA PRIMAVERA TAPIA BARRERA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

**A PROBAR**

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



NADIA PRIMAVERA TAPIA BARRERA  
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. ALEJANDRO ZAMILPA ALVAREZ

VOCAL

DRA. MARIA DEL PILAR NICASIO TORRES

VOCAL

DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO

SECRETARIO

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

México D.F. a 18 de Diciembre del 2014

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis  
**Producción de taxol y taxanos relacionados en cultivos de células en suspensión de  
*Taxus globosa* (Schltdl)**

---

que presentó

M.C. Nadia Primavera Tapia Barrera

---

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Co-Directora: Dra. Lidia Teresa Osuna Torres

Asesor: Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez




**Jurado:**

Presidente: Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez

Secretario: Dr. Fernando Rivera Cabrera

Vocal: Dra. María del Pilar Nicasio Torres

Vocal: Dr. Antonio Bernabé Antonio

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
Ma. del Pilar Nicasio T.  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

**El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 001466**

**La M. en C. Nadia Primavera Tapia Barrera recibió la beca de CONACyT con el número de registro 248629 y apoyo complementario como Becaria de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número de registro 2011044.**

**El proyecto de tesis contó con financiamiento del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de proyecto: FIS/IMSS/PROT/G12/1151**

## AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero dar gracias a Dios por permitirme vivir y disfrutar cada momento de mi vida.

A mi director de tesis el **Dr. Francisco Cruz Sosa** por aceptarme como su alumna, por las facilidades y apoyo brindado para el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A mi co-directora de tesis la **Dra. Lidia Osuna Torres**, mi más sincero agradecimiento por su valioso e incondicional apoyo. Gracias por su tiempo, por sus enseñanzas en el trabajo de investigación y por todos los consejos que enriquecieron y seguirán haciéndolo a lo largo de mi vida profesional y personal.

Al **Dr. Alejandro Zamilpa** por su apoyo y asesoría durante el trabajo de investigación sobre los diferentes aspectos fitoquímicos, principalmente en el uso y manejo de las técnicas cromatográficas.

Al **Posgrado de Biotecnología** de la UAM-I por la facilidades brindadas para realizar las estancias de investigación en el Centro de Investigación Biomédica de Sur (CIBIS-IMSS) y en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. A los coordinadores **Dr. Francisco José Fernández** y **Dr. Hector Escalona**, por su apoyo en los diferentes tramites administrativos y económicos para asistir a Congresos y obtención del grado de Doctor.

Al **Dr. Javier Palazón**, por aceptarme en su grupo de investigación en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, España, por compartir sus conocimientos, por hacer de mi estancia agradable y enriquecedora y por todo el apoyo en el desarrollo del trabajo de investigación, aún a la distancia.

A la **Dra. Mercedes Bonfill** por el apoyo en la revisión de los resultados de investigación y publicación de los mismos.

A la **Dra. Rosa María Cusidó** por compartir sus conocimientos sobre cultivos de *Taxus*, y por brindarme su apoyo durante mi estancia de investigación y por todas sus atenciones gracias.

Al **Dr. Jaime Tortoriello**, Director del Centro de Investigación Biomédica del Sur (IMSS), por las facilidades dadas para desarrollo este trabajo de tesis, al permitir realizar parte de m investigación en sus instalaciones. A los **técnicos Flor Martínez**, sin tu apoyo hubiera sido complicado el trabajo en el laboratorio, **Arturo y Jonathan** por su ayuda durante mi estancia en el CIBIS y a todo el personal de apoyo **Carlos, Don Goyo, Don Rene, Don Juan e Irving**.

A la **M.C. Laura Ávila** por su apoyo durante mi periodo como becaria del IMSS.

A la **Dra. Pilar Nicasio**, por su apoyo con los trámites de la beca del IMSS, así como durante mi estancia en el CIBIS y por formar parte de mi comité revisor de la tesis.

Al **Dr. Antonio Bernabé** y el **Dr. Fernando Rivera** por aceptar ser parte de mi comité revisor de la tesis y sinodales.

Al **Dr. Javier López Upton** por el apoyo brindado durante la colecta del material vegetal de *Taxus globosa*.

A mis compañeros de laboratorio gracias por compartir conmigo un etapa más en mi vida y por el apoyo brindado, en México a **Paty, Juanita, Carol, Naty, Brenda, Miriam, Mayte, Alejandro<sup>†</sup>, Francisco, Martín y Jade**; en España a **Karla, Rafa, Ana, Miriam, Ana Belen, Liliana, Diego y Vincenzo** por hacer de mi estancia en Barcelona agradable y divertida, espero no haber olvidado a nadie.

Agradezco también a todo el personal administrativo del CIBIS y la UAM-I por el apoyo en los diferentes tramites administrativos durante el desarrollo de mi tesis.

A cada uno de mis familiares y amigos que contribuyeron para que yo lograra una meta más en mi vida. A cada uno GRACIAS.

## DEDICATORIA

### **A mis padres Edith y Victor**

*Por su incondicional e invaluable apoyo, la confianza que me ha dado fuerza para lograr una más de mis metas, sin ustedes difícilmente lo hubiera logrado. Los amo!!!*

### **A mis hermanos Kari y Victor**

*Por su apoyo y cariño. Los quiero mucho!!!  
Sin importar las diferencias que tengamos se que cuento con ustedes y ustedes conmigo.*

### **A mis sobrinos Emilio y Azul**

*Por arancarme una sonrisa aún en los momentos más difíciles. Son el regalo más hermoso que me ha dado la vida.*

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	7
<b>2. ANTECEDENTES GENERALES</b>	9
2.1. Género <i>Taxus</i> .	9
2.1.1. Descripción botánica.	10
2.1.2. Etnobotánica.	11
2.1.2.1. Usos tradicionales y místicos.	11
2.1.3. Actividades biológicas de diferentes especies de <i>Taxus</i> .	12
2.2. Taxol.	13
2.2.1. Descubrimiento del taxol.	13
2.2.2. Estructura química del taxol.	14
2.2.3. Avances en la biosíntesis del taxol.	15
2.2.4. Mecanismo de acción del taxol.	24
2.2.5. Problemática para el abastecimiento de taxol a partir de fuentes naturales.	25
2.2.6 Fuentes alternas para la obtención y producción de taxol.	26
2.3. Cultivo <i>in vitro</i> de vegetales.	28
2.3.1. Establecimiento de cultivos vegetales.	28
2.3.2. Establecimiento de los cultivos de callo.	29
2.3.3. Establecimiento de los cultivos de células en suspensión.	29
2.3.4. Estrategias biotecnológicas para incrementar el metabolismo secundario en los cultivos <i>in vitro</i> .	30
2.3.5. Estimulación.	32



	<b>Pág.</b>
2.3.6. Inmovilización celular.	33
2.3.7. Cultivo <i>in vitro</i> de diferentes especies del género <i>Taxus</i> .	35
2.4. Antecedentes generales sobre <i>Taxus globosa</i> Schtdl.	36
2.4.1. Descripción Botánica de <i>T. globosa</i> .	36
2.4.2. Características distintivas.	37
2.4.3. Biología y hábitat.	37
2.4.4. Distribución geográfica en México.	37
2.4.5. Aspectos fitoquímicos y actividad biológica de <i>T. globosa</i> .	38
2.4.6. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>T. globosa</i> .	41
<b>3. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>42</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>43</b>
<b>5. OBJETIVOS GENERALES</b>	<b>43</b>
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>43</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
7.1. Establecimiento de los cultivos <i>in vitro</i> de <i>T. globosa</i> .	45
7.1.1. Inducción y establecimientos de los cultivos de callo.	45
7.1.2. Crecimiento celular y producción de taxanos en callos de <i>T.globosa</i> .	46
7.2. Establecimiento de cultivos de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	46
7.3. Determinación del tamaño de inóculo.	46
7.4. Efecto del jasmonato de metilo (MeJ) en la estimulación de la producción de taxol y taxanos relacionados, en los cultivos tipo lote de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	47
7.5. Evaluación del efecto del calcio (Ca <sup>2+</sup> ) y jasmonato de metilo (MeJ) sobre la producción de taxol y taxanos relacionados en cultivos tipo lote en dos fases, de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	48

	<b>Pág.</b>
7.6. Efecto de la inmovilización celular en los cultivos tipo lote en dos fases de células de <i>T. globosa</i> .	49
7.7. Metodología química y análisis cromatográfico.	50
7.7.1. Extracción de taxanos a partir de biomasa.	50
7.7.2. Extracción de taxanos a partir del medio de cultivo.	51
7.8. Identificación y cuantificación de taxanos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).	51
7.9. Estimación de consumo de carbohidratos mediante CLAR.	52
7.10. Variables de respuesta que se determinaron.	52
7.10.1 Parámetros de crecimiento.	52
7.10.2. Parámetros de producción.	53
7.11. Viabilidad celular.	53
7.12. Análisis estadístico.	54
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>55</b>
8.1 Inducción y establecimiento de cultivos de callos.	55
8.2. Crecimiento celular y producción de taxanos en callos de <i>T. globosa</i> .	56
8.3. Establecimiento de cultivos de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	58
8.4. Determinación del tamaño de inóculo	58
8.5. Efecto del jasmonato de metilo (MeJ) en la estimulación de la producción de taxol y taxanos relacionados, en los cultivos tipo lote de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	62
8.6. Efecto del calcio (Ca <sup>2+</sup> ) y jasmonato de metilo (MeJ) sobre la producción de taxol y taxanos relacionados en los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	67
8.7. Efecto de la inmovilización celular sobre la producción de taxol y taxanos relacionados en los cultivos de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	70
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>78</b>

	<b>Pág.</b>
<b>10. DISCUSIÓN</b>	81
<b>11. PERSPECTIVAS</b>	87
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	88
<b>ANEXO</b>	105

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Lista de las enzimas conocidas que participan en la biosíntesis de taxol. Abreviatura asociada y publicación en la que aparecieron clonados los genes por primera vez.	22
Tabla 2. Contenido de taxol y taxanos relacionados en diferentes especies del género <i>Taxus</i>	40
Tabla 3. Obtención de diferentes metabolitos a partir de cultivos <i>in vitro</i> de <i>T. globosa</i>	41
Tabla 4. Tratamientos utilizados en la evaluación del efecto de CaCl <sub>2</sub> y MeJ sobre la producción de taxanos, en los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	48
Tabla 5. Contenido de taxanos en callos de <i>T. globosa</i> cultivados en B5 o WPM, suplementados con PIC, CN y GA <sub>3</sub> .	58
Tabla 6. Efecto del tamaño de inóculo (PF) en la producción de taxanos en los cultivos de células en suspensión de <i>T. globosa</i>	61
Tabla 7. Parámetros de producción de taxanos totales (intra y extra celular), en los cultivos tipo lote de células en suspensión de <i>T. globosa</i> , en medios WPM y B5 sin y con MeJ (100 μM).	65
Tabla 8. Efecto de la estimulación con CaCl <sub>2</sub> y MeJ sobre la producción de taxanos totales (intra y extra celular), en los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de <i>T. globosa</i> (segunda fase o de producción).	69
Tabla 9. Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de taxanos, en los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	73
Tabla 10. Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de taxanos, en los cultivos tipo lote en dos fases de células inmovilizadas de <i>T. globosa</i> .	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Distribución geográfica de las especies del género <i>Taxus</i> en el mundo.	9
Figura 2. Características morfológicas de las ramas de los árboles del género <i>Taxus</i> . A) Segmento de una rama con semillas, B) Segmento de una rama con estróbilos, C) Semillas y D) Estróbilos.	10
Figura 3. Estructura química de la molécula de taxol.	15
Figura 4. Ciclación de GGPP catalizado por la enzima taxadieno sintasa (TS) que produce dos compuestos isómeros de taxadieno.	16
Figura 5. Hidroxilación del C5 y migración del doble enlace desde la posición 4(5) a la posición 4(20) del taxadieno catalizada por la enzima taxadieno-5 $\alpha$ -hidroxilasa (T5 $\alpha$ OH).	17
Figura 6. Primera bifurcación de la ruta de biosíntesis de taxol. El taxa-4(20),11(12)-dieno-5 $\alpha$ -ol puede ser modificado por TAT o T13 $\alpha$ OH. Tras la acilación este sustrato puede ser modificado por otras hidroxilasas.	18
Figura 7. Formación de 10-deacetilbaccatina III y la baccatina III a partir de un precursor hidroxilado.	19
Figura 8. Síntesis de $\beta$ -fenilalanina CoA a partir de $\alpha$ -fenilalanina.	19
Figura 9. Etapa final de la biosíntesis, a partir de baccatina III. Esterificación de C13 por BAPT, hidroxilación en C2' por una hidroxilasa desconocida y benzoilación en C3' por DBTNBT.	21
Figura 10. Ruta general de biosíntesis de taxol.	23
Figura 11. Mecanismo de acción del taxol.	24
Figura 12. Estructura química del taxol y 5 taxanos relacionados (van Rozendaal et al 2000).	26
Figura 13. Ramas del árbol de <i>T. globosa</i> silvestre. Foto tomada en el Estado de Hidalgo (Tapia 2010).	36
Figura 14. a) Estróbilos femeninos (semillas) y b) Estróbilos masculinos de árbol de <i>T. globosa</i> silvestre (Tapia 2010).	37
Figura 15. Distribución geográfica de <i>T. globosa</i> en México (CONABIO, 2001).	38

	<b>Pág.</b>
Figura 16. Proceso de inmovilización de células de <i>T. globosa</i> en perlas de alginato. (a) Células en la solución de alginato en el medio de cultivo. (b) Adición de la solución de alginato conteniendo las células en la solución de CaCl <sub>2</sub> . (c) Perlas (células encapsulas) en solución de CaCl <sub>2</sub> en agitación. (d) Filtrado y lavado de perlas. (e) Perlas subcultivadas en el medio WPM.	50
Figura 17. Cromatograma de los 5 taxanos cuantificados por CLAR.	52
Figura 18. Diferentes etapas de formación de callos de hojas (A) y tallos (B) de <i>T. globosa</i> en medio B5 (TI).	55
Figura 19. Diferentes morfologías celulares observadas en las células en suspensión de <i>T. globosa</i> . 1. <i>Esférica</i> , 2. <i>En forma de riñon</i> , 3. <i>Alargada</i> .	64

## ÍNDICE DE GRAFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Efecto del medio de cultivo WPM y B5 añadidos de PIC, CN y GA <sub>3</sub> , sobre el crecimiento celular en los cultivos de callo de <i>T. globosa</i> .	57
Grafica 2. Efecto del tamaño de inóculo sobre el crecimiento celular de los cultivos tipo lote de <i>T. globosa</i> .	59
Grafica 3. Consumo de los carbohidratos en los cultivos tipo lote de <i>T. globosa</i> (inóculo de 50 g PF/L).	60
Gráfica 4. Efecto del medio de cultivo WPM + PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA <sub>3</sub> (0.5 mg/L) y la estimulación con MeJ (100 µM), sobre el crecimiento celular en los cultivos tipo lote de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	63
Gráfica 5. Efecto del medio de cultivo B5 + PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA <sub>3</sub> (0.5 mg/L) y la estimulación con MeJ (100 µM), sobre el crecimiento celular en los cultivos tipo lote de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	63
Gráfica 6. Efecto del medio de cultivo WPM y B5 con y sin MeJ en la producción de taxol en células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	66
Grafica 7. Efecto del calcio (Ca <sup>2+</sup> ) y jasmonato de metilo (MeJ) sobre el crecimiento celular de los cultivos tipo lote en dos fases de <i>T. globosa</i> .	68
Grafica 8. Cinética de crecimiento celular en los cultivos tipo lote en dos fases, de célula en suspensión de <i>T. globosa</i> .	71
Grafica 9. Consumo de los carbohidratos en células libres en la segunda fase o de producción en los cultivos tipo lote en dos fases, de células en suspensión de <i>T. globosa</i> .	71
Gráfica 10. Producción de taxanos totales en los cultivos tipo lote en dos fases, de células en suspensión de <i>T. globosa</i> . Datos correspondientes a la segunda fase o de producción: <b>(T1)</b> medio B5 + 2,4-D, BAP y GA <sub>3</sub> y <b>(T2)</b> medio B5 + PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA <sub>3</sub> (0.5 mg/L), con y sin MeJ (100µM).	72
Gráfica 11. Cinética de crecimiento celular en los cultivos tipo lote en dos fases, de células inmovilizadas de <i>T. globosa</i> . n=3±DE. Tratamientos: T1 (B5 + 2,4-D, BAP y GA <sub>3</sub> ); T1+MeJ (B5 + 2,4-D, BAP y GA <sub>3</sub> + MeJ 100µM); T2 (B5 + PIC, CN y GA <sub>3</sub> ); T2+MeJ (B5 + PIC, CN y GA <sub>3</sub> + MeJ 100µM).	74

	<b>Pág.</b>
Grafica 12. Consumo de los carbohidratos en la segunda fase o producción en los cultivos tipo lote en dos fases, de células inmovilizadas de <i>T. globosa</i> .	75
Gráfica 13. Producción de taxanos totales en los cultivos tipo lote en dos fases, de células inmovilizadas de <i>T. globosa</i> . Datos correspondiente a la segunda fase o de producción: <b>(T1)</b> medio B5 añadido de 2,4-D, BAP y GA <sub>3</sub> y <b>(T2)</b> medio B5 añadido de PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA <sub>3</sub> (0.5 mg/L), con y sin MeJ (100µM).	76



## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µ <sub>max</sub>	Velocidad máxima de crecimiento
10-DB III	10-deacetilbaccatina III
10-DT	10-deacetiltaxol
2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
a. C.	antes de Cristo
ANA	Ácido Naftalenacético
B III	baccatina III
B5	Medio Gamborg
BAP	Benzilaminopurina
BAPT	taxano-C13- <i>O</i> -fenilpropanoil-CoA transferasa
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
ccc	Cloruro de clorocolina
CCNSC	Cancer Chemotherapy National Service Center
Cef	cefalomanina
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
CHO	Células de ovario de hámster chino
citP540	Citocromo P450
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Metanol
CN	Cinetina
CoA	Coenzima A
DAF	Diacetato de fluoresceína
DBAT	10-deacetilbaccatina III-10- <i>O</i> -acetil transferasa
DBTNBT	N-benzoil transferasa
DE	Desviación estándar
DMAPP	Dimetilalil difosfato
FDA	Food and Drug Administration (USA)
g	gramo
GA <sub>3</sub>	Acido giberélico
GDP	Guanosin disfosfato
GGPP	Geranilgeranil difosfato
GGPPS	Geranilgeranil difosfato sintasa
GTP	Guanosin trifosfato
h	hora (s)
H <sub>2</sub> O	Agua
IC	Índice de crecimiento
IPP	Geranilgeranil difosfato
JA	Velocidad máxima de crecimiento
JMT	ácido jasmónico carboxil metiltransferasa
Kg	Kilogramo
L	Litro

$\lambda$	Longitud de onda
m	Metro
M	Molar
MeJ	Jasmonato de metilo
MeOH	Metanol
MEP	Vía alternativa del no mevalonato o metileritritol fosfato
mg	Miligramo
Min	Minuto (s)
mL	Mililitro
mm	Milimitro
MS	Medio Murashige & Skoog
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NCI	Intituto Nacional del Cáncer (USA)
nm	Nanometro
PAM	Fenilalanina aminomutasa
PF	Peso Fresco
PIC	Picloram
PS	Peso Seco
rpm	Revoluciones por Minuto
seg	Segundo (s)
SEMARNAT	Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales
SH	Medio Schenk & Hidebrandt
<i>T. baccata</i>	<i>Taxus baccata</i> L.
<i>T. brevifolia</i>	<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.
<i>T. canadensis</i>	<i>Taxus canadensis</i> Marshall.
<i>T. chinensis</i>	<i>Taxus chinensis</i> Rehder.
<i>T. cuspidata</i>	<i>Taxus cuspidata</i> Sieb & Zucc.
<i>T. globosa</i>	<i>Taxus globosa</i> Schltdl.
<i>T. willichiana</i>	<i>Taxus willichiana</i> Zucc.
T1 $\beta$ OH	taxano-1 $\beta$ -hidroxilasa
T2 $\alpha$ OH	taxano-2 $\alpha$ -hidroxilasa
T5 $\alpha$ OH	taxadieno-5 $\alpha$ -hidroxilasa
T7 $\beta$ OH	taxano-7 $\beta$ -hidroxilasa
T9 $\alpha$ OH	taxano-9 $\alpha$ -hidroxilasa
T10 $\beta$ OH	taxano-10 $\beta$ -hidroxilasa
T13 $\alpha$ OH	taxadieno-13 $\alpha$ -hidroxilasa
T14 $\beta$ OH	taxano-14 $\beta$ -hidroxilasa
TBT	taxano-2 $\alpha$ -O-benzoil transferasa
td	Tiempo de duplicación
TDAT	taxadieno-5 $\alpha$ -ol-O-acetil transferasa
TS	taxadieno sintasa
USDA	Departamento de Agricultura de America (USA)
UV	ultravioleta
WPM	Woody Plant Medium

## RESUMEN

*Taxus globosa* Schltdl. (Taxaceae) “tejo mexicano”, es la única especie del género *Taxus* que crece en la República Mexicana. Por la rareza de la especie, por su lento crecimiento y poca densidad poblacional, es un árbol protegido por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). El árbol silvestre de *T. globosa* ha sido estudiado desde el punto de vista fitoquímico desde 2000 a la fecha, demostrando que la especie produce taxol y taxanos relacionados con importante actividad anticancerígena, a diferencia de otras especies de *Taxus*, la mayor acumulación de taxol ocurre en las hojas y en los tallos jóvenes.

Objetivo. Dada la importancia de su potencial biosintético con respecto a la producción de taxanos bioactivos, se iniciaron los cultivos *in vitro* de *T. globosa*, para evaluar diferentes estrategias biotecnológicas como son: el tipo de cultivo, formulación del medio de cultivo, cultivo tipo lote y cultivo en dos fases, el uso de estimuladores e inmovilización celular, con la finalidad de incrementar la producción de taxol y taxanos relacionados y estimular su excreción al medio de cultivo.

Resultados. Se realizaron los experimentos de establecimiento de los cultivos de callo y células en suspensión, donde se obtuvieron callos derivados de hojas y tallos jóvenes de *T. globosa* a partir del tiempo 20 días en medio Gamborg (B5) añadido de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (2 mg/L), cinetina (CN) (0.5 mg/L) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (0.25 mg/L). El crecimiento y la producción de taxanos en cultivos de callo se evaluó en dos medios de cultivo: Woody Planta Medium (WPM) y B5 añadidos de picloram (PIC) (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L). Los callos cultivados en medio B5 presentaron un índice de crecimiento (IC) de 0.44 y un tiempo de duplicación (td) de 13.81 días. Por otro lado, los callos cultivados en medio WPM tuvieron mayor IC (0.70) y un td de 13.2 días.

Los cultivos de callos cultivados en los dos medios (B5 y WPM) produjeron taxol y 3 taxanos entre ellos: la baccatina III, 10-deacetilbaccatina III y 10-deacetiltaxol; estos taxanos se producen desde el inicio de los cultivos y hasta el final de los mismos en forma cíclica, obteniendo la mayor producción de taxol en el medio B5 durante la 1ª semana (50 µg/g PS) de cultivo, esta producción fue el doble y se obtuvo en menor tiempo que en el medio WPM (24 µg/g PS).

Los cultivos de células en suspensión se establecieron a partir de callos friables derivados de hojas de *T. globosa*. Se realizaron los experimentos para determinar el tamaño de inóculo más adecuado para esta especie (50, 100 y 150 g PF/L), donde se determinó que

el tamaño de inóculo de 50 g PF/L fue el adecuado para establecer las cinéticas de crecimiento celular en medio WPM, en los cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa* y se obtuvo un IC de 0.65 y un td 3.9 días. En el establecimiento de los cultivos tipo lote de células en suspensión se evaluaron los medios WPM y B5 añadidos de PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) y la estimulación con jasmonato de metilo (MeJ) (100 μM). El medio que estimuló el crecimiento celular fue el WPM con un IC de 6.14 y un td de 2.32 días. El medio de cultivo WPM añadido de MeJ estimuló la producción del taxol (197.999 μg/L) y tres taxanos más como son 10-deacetilbaccatina III (633.724 μg/L), 10-deacetiltaxol (229.611 μg/L) y baccatina III (160.622 μg/L).

En base a los resultados obtenidos en la evaluación de los medios WPM y B5, donde observamos que el WPM estimuló el crecimiento celular y por otro lado, el medio B5 estimuló la excreción de los taxanos al medio de cultivo, se decidió evaluar por primera vez en cultivos líquidos de *T. globosa*, la estrategia de cultivos tipo lote en dos fases y la estimulación con calcio (Ca<sup>2+</sup>) y MeJ. En esta etapa se corroboró que el MeJ inhibe el crecimiento celular en los cultivos de *T. globosa*. Con respecto a la producción de los taxanos, observándose que el efecto del Ca<sup>2+</sup> combinado con el MeJ incrementó la productividad de 3 taxanos: taxol (16.299 – 34.516 μg/L día<sup>-1</sup>), baccatina III (4.673 – 26.287 μg/L día<sup>-1</sup>) y cefalomanina (2.435 – 151.995 μg/L día<sup>-1</sup>) con una excreción de 41 al 60 %, con esta estrategia biotecnológica no se logró estimular la producción del 10-deacetiltaxol.

En la última etapa del trabajo de investigación, se evaluó por primera vez en los cultivos celulares del tejo mexicano, el efecto de la inmovilización celular y la estimulación con MeJ (100 μM), en medio Gamborg B5 (B5) añadido de dos tratamientos que contenían 2,4-D (T1) y PIC (T2), en combinación con CN y benzilaminopurina (BAP). Para ello se empleó los cultivos tipo lote en dos fases, con la finalidad de estimular en la segunda fase o de producción, la biosíntesis de los taxanos con respecto al factor tiempo, así como su excreción en los cultivos celulares de *T. globosa*. La productividad y el porcentaje de excreción al medio de cultivo de 4 taxanos: baccatina III (8.260 – 12.7888 μg/L día<sup>-1</sup>)( 81%); 10-deacetilbaccatina III (15 μg/L día<sup>-1</sup>); 10 deacetiltaxol (3.180 μg/L día<sup>-1</sup> )( 62%) y cefalomanina (49.272 μg/L día<sup>-1</sup>), se estimuló principalmente, por efecto del tratamiento T1 en los cultivos de células libres y estimulados con MeJ, a partir del tercer día y hasta al final de la segunda fase de la cinética. Por el contrario, la productividad del taxol (53 μg/L día<sup>-1</sup>) se obtuvo por efecto del tratamiento T2 añadido de MeJ de manera intracelular tanto en células

libres como inmovilizadas, el tiempo de la biosíntesis *in vitro* del taxol disminuyó de 15 días a 3 días en fase de producción, incrementando al doble su productividad ( $130.347 \mu\text{g/L día}^{-1}$ ) en los cultivos de células inmovilizadas y estimuladas con MeJ de *T. globosa*. Nuestros resultados indican que para estimular la producción de los precursores del taxol (baccatina III y 10-deacetilbaccatina III) además de la cefalomanina y el 10-deacetiltaxol, no es necesario inmovilizar los cultivos de células en suspensión de la especie. Asimismo, la velocidad de biosíntesis del taxol *in vitro* se incrementó por efecto de la inmovilización celular y del estímulo del jasmonato de metilo en sinergia con las fuentes de carbono utilizadas en esta investigación.

## ABSTRACT

*Taxus globosa* Schlttdl. (Taxaceae) "Mexican yew", is the only species of the genus *Taxus* growing in Mexico. Due to the rarity of the species, slow growth and low population density, the tree is protected by the Secretary of Environment and Natural Resources (SEMARNAT). The wild tree *T. globosa* has been studied from the phytochemical point of view from 2000 up to this date, showing that the species produces taxol and taxanes, related to important anticancer activity; unlike other species of *Taxus*, the largest accumulation of taxol occurs in the leaves and young stems.

**Objective.** Because of the importance of its biosynthetic potential in connection with the production of bioactive taxanes, in vitro cultures of *T. globosa* were initiated to evaluate the different biotechnological strategies such as: type of culture, the culture medium formulation, batch type culture and cultivation in two phases, the use of stimulators and cell immobilization, in order to increase the production of taxol and related taxanes, and stimulate its excretion into the culture medium.

**Results.** Experiments for the establishment of callus cultures and suspension cells were carried out, and as a result, obtained calli derived from young leaves and stems of *T. globosa* time from 20 days to Gamborg (B5) addition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (2 mg/L), kinetin (KN) (0.5 mg/L) and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (0.25 mg/L). Growth and taxane production in callus cultures were evaluated in two culture media: Woody Plant Medium (WPM) and B5 added picloram (PIC) (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L). Callus grown on B5 medium showed a growth index (GI) of 0.44, and a doubling time (dt) of 13.81 days. Furthermore, callus cultured in medium WPM had higher GI (0.70), and a td of 13.2 days.

The callus cultures grown in the two mediums (B5 and WPM), produced taxol and 3 taxanes including: baccatin III, 10-deacetylbaccatin III, and 10-deacetiltaxol. These taxanes are produced from the start to the end of the cultures, cyclically, reaching the highest production of taxol in the B5 medium, during the 1st week (50 µg/g PS) of culture; this doubled up production, and obtained it in less time than medium WPM (24 µg/g PS).

The cell suspension cultures were established from friable calli derived from *T. globosa* leaves. Experiments were carried out to determine the size of the inoculum most suitable for this species (50, 100 and 150 g FW/L); it was determined that the inoculum size of 50 g FW/L was the best suited to establish the kinetics of cellular growth in medium WPM, in the batch type culture cell suspension of *T. globosa*; an IG of 0.65 and 3.9 days dt were obtained. In establishing the batch type culture cell suspensions, the WPM and B5 media added PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L), and the stimulation of methyl jasmonate (MeJ) (100 μM), were evaluated. The medium that stimulated cell growth was the WPM with a GI of 6.14 and a td of 2.32 days. The WPM culture medium with MeJ added, stimulated production of taxol (197.999 μg/L) and three taxanes more, such as 10-deacetylbaaccatin III (633.724 μg/L), 10-deacetiltaxol (229.611 μg/L) and baaccatin III (160.622 μg/L).

Based on the assessment of the results obtained for the WPM and B5 media, where we observe that the WPM stimulated cell growth and the B5 medium stimulated excretion of taxanes in the culture medium, it was decided to test for the first time in liquid cultures of *T. globosa*, the strategy type culture batch in two phases and stimulation with calcium (Ca<sup>2+</sup>) and MeJ.

At this stage it was confirmed that the MeJ inhibits cellular growth in cultures of *T. globosa*. Regarding the production of taxanes, observing the effect of Ca<sup>2+</sup> combined with MeJ, the productivity of 3 taxanes increased: taxol (16.299 - 34.516 μg/L day<sup>-1</sup>), baaccatin III (4.673 - 26.287 μg/L day<sup>-1</sup>) and cephalomannin (2.435 - 151995 μg/L day<sup>-1</sup>) with an excretion of 41 to 60%; this biotechnology strategy was unsuccessful, it did not to stimulate production of 10-deacetiltaxol.

In the last stage of the research, it was evaluated for the first time, in cell cultures of the Mexican yew, the effect of cellular immobilization and stimulation with MeJ (100 μM), in medium Gamborg B5 (B5) added of two treatments containing 2,4-D (T1) and PIC (T2), in combination with KN and benzylaminopurine (BAP). To this end, batch-type cultures in two stages were used, with the goal to stimulate in the second phase or production, the biosynthesis of taxane over the time factor, and also its excretion in the cell cultures of *T. globosa*. Productivity and the rate of excretion into the culture medium of 4 taxanes: baaccatin III (8.260 - 12.7888 μg/L day<sup>-1</sup>) (81%); 10-deacetylbaaccatin III (15 μg/L day<sup>-1</sup>); 10 deacetiltaxol (3.180 μg/L day<sup>-1</sup>) (62%) and cephalomannin (49.272 μg/L day<sup>-1</sup>), was mainly stimulated by the effect of treatment T1 in the crop of free cells, and stimulated it with MeJ, from the third

day and until the end of the second kinetics phase. Conversely, the productivity of taxol ( $53 \mu\text{g/L day}^{-1}$ ) was obtained by treatment effect of T2 MeJ added intracellularly in both free and immobilized cells; the time of the taxol biosynthesis in vitro decreased from 15 days to 3 days in the production phase, doubling up its productivity ( $130.347 \mu\text{g/L day}^{-1}$ ) in cultured and immobilized cells, stimulated with MeJ of *T. globosa*. Our results indicate that to stimulate the production of precursors of taxol (baccatin III and 10-deacetyl baccatin III), in addition to the cephalomannin and the 10-deacetyl taxol, it is not necessary to immobilize the cells in suspension cultures of the species. Furthermore, the rate of taxol biosynthesis in vitro was increased by the effect of cell immobilization and encouragement of methyl jasmonate in synergy with the carbon sources used in this research.



## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Taxus* pertenece al orden de los Taxales y a la familia Taxaceae, del cual destacan la presencia de 8 especies, que aunque son similares, se diferencian en su distribución geográfica: *Taxus baccata* (tejo europeo o inglés), *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico), *Taxus cuspidata* (tejo japonés), *Taxus canadienses* (tejo de Canadá), *Taxus floridana* (tejo de Florida), *Taxus globosa* (tejo mexicano), *Taxus wallichiana* (tejo del Himalaya) y *Taxus chinensis* (tejo chino). Además se ha reportado la existencia de dos híbridos: *Taxus x media* como resultado de la cruzamiento entre *T. baccata* con *T. cuspidata* y *Taxus x hunnewelliana* como resultado de la cruzamiento entre *T. cuspidata* con *T. canadienses* (Malik et al. 2011).

Este género *Taxus* ha generado un gran interés debido a su contenido de alcaloides diterpénicos, particularmente el taxol, que es uno de los metabolitos secundarios con importante actividad anticancerígena; sus propiedades fueron descubiertas a partir de los extractos obtenidos de la corteza de *T. brevifolia* en 1971 (Wani et al. 1971). Actualmente se obtiene de diferentes especies de *Taxus*, su producción natural varía entre especies y ocurre por lo general en bajas concentraciones, por lo que la opción más viable ha sido el cultivo *in vitro* de callos y células en suspensión.

En los cultivos *in vitro* de las diferentes especies de *Taxus*, se han evaluado diversas estrategias biotecnológicas para estimular e incrementar la producción de taxol, así como sus precursores y demás taxanos, como son: el tipo de medio, la adición al medio de cultivo de diferentes reguladores de crecimiento, así como la estimulación biótica y abiótica, utilizando diferentes tipos de cultivo como son: cultivo tipo lote y cultivo tipo lote en dos fases, la inmovilización celular y el escalamiento a biorreactores, entre otros (Malik et al. 2011).

*Taxus globosa* Schltld conocido principalmente como “tejo mexicano”, es la única especie del género *Taxus* que crece en la República Mexicana. Su distribución geográfica es restringida y se ubica en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Oaxaca y Chiapas. Crece en ambientes montañosos húmedos y templados a 3400 msnm. Por la rareza de la especie, su lento crecimiento y poca densidad

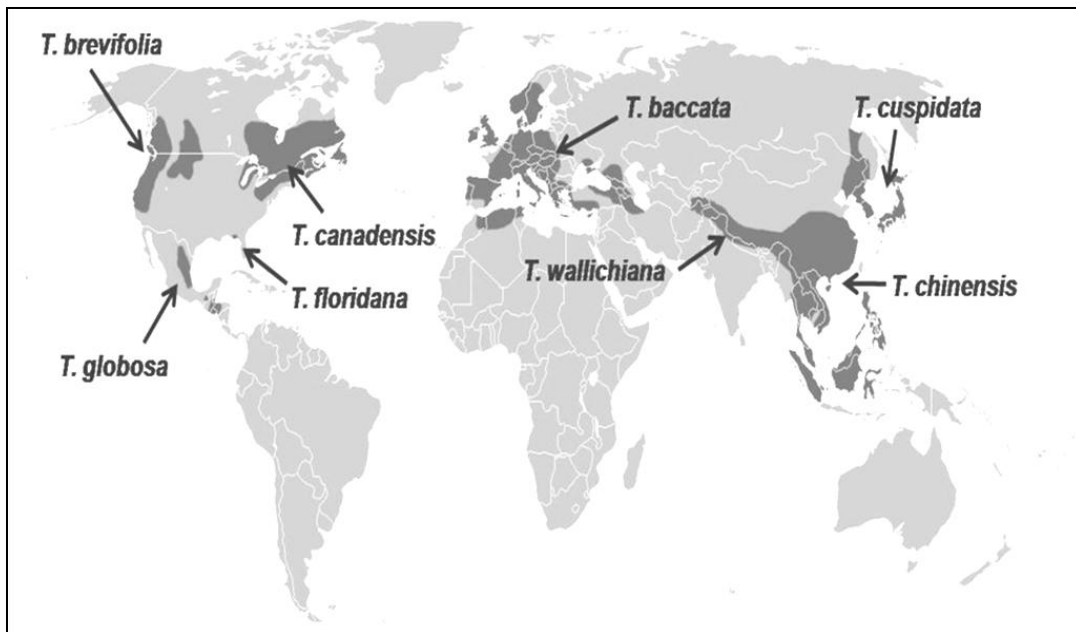
poblacional, se le considera una especie protegida por la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). El árbol silvestre de *T. globosa* ha sido estudiado desde el punto de vista fitoquímico desde 1993 a la fecha (Strobel et al. 1993), demostrando que la especie presenta altos contenidos de taxol y taxanos relacionados, con importante actividad anticancerígena, pero a diferencia de las otras especies del género *Taxus*, cuyos taxanos se acumulan principalmente en la corteza, en el tejo mexicano la mayor acumulación ocurre en las hojas y en los tallos jóvenes. Un estudio comparativo del contenido de taxanos realizado por van Rozendaal et al. en el 2000, mostró que *T. globosa* es una de las especies con mayor contenido de taxanos y en específico de taxol (433 µg/g PS), en comparación con las demás especies del género. A partir de *T. globosa* se han aislado otros metabolitos secundarios como son: β-sitosterol, β-sitosteril-β-D-glucopiranosido, ácido vanílico y un peracetil taxano identificado como 5α,7β,9α,10β,13α-pentaacetoxi-4(20),11-taxadieno (7β-acetoxi-taxusina,2) (Guerrero et al. 2000). Dada la importancia de su potencial biosintético con respecto a la producción de taxanos bioactivos, se iniciaron los cultivos *in vitro* de *T. globosa*. Es así que a partir del 2009 diferentes grupos en México se han interesado en el establecimiento de los cultivos *in vitro* de *T. globosa*, obteniéndose los cultivos de callos y células en suspensión a partir de la acículas y tallos jóvenes, con la finalidad de producir taxol así como de los diferentes taxanos marcadores de la especie (Barrios et al. 2009; Barradas-Dermitz et al. 2010; Barrales et al. 2011). A la fecha, la producción *in vitro* de taxanos en *T. globosa* que ha sido reportado, es muy baja con respecto a otras especies del género, obteniendo en algunos casos trazas del taxol y otros taxanos (Barrales et al. 2011) o bien incluso líneas celulares que no producen taxol (Barradas-Dermitz et al. 2010). Por lo que es necesario continuar con los estudios sobre el metabolismo *in vitro* de la producción de taxanos a partir de cultivos celulares de *T. globosa*. Es por eso que en este trabajo de investigación evaluamos diferentes estrategias biotecnológicas para incrementar la producción y excreción al medio de cultivo de taxol y taxanos relacionados, como son: el tipo de cultivo, formulación del medio de cultivo, cultivo tipo lote y cultivo en dos fases, el uso de estimuladores e inmovilización celular.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1. Género *Taxus*

El género *Taxus* pertenece al orden de los Taxales y a la familia Taxaceae, en el que se incluyen 24 especies y 55 variedades (Spjut, 2007). De las cuales, 8 especies son las más reconocidas y estudiadas, que aunque son similares, se diferencian en su distribución geográfica: *Taxus baccata* (tejo europeo o inglés), *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico), *Taxus cuspidata* (tejo japonés), *Taxus canadensis* (tejo de Canadá), *Taxus floridana* (tejo de Florida), *Taxus globosa* (tejo mexicano), *Taxus wallichiana* (tejo del Himalaya) y *Taxus chinensis* (tejo chino). Además se ha reportado la existencia de dos híbridos: *Taxus x media* como resultado de la cruzamiento entre *T. baccata* con *T. cuspidata* y *Taxus x hunnewelliana* como resultado de la cruzamiento entre *T. cuspidata* con *T. canadensis* (Malik et al. 2011).

Las especies de este género son propias del hemisferio norte y sólo las originarias de Asia se localizan por debajo de la línea ecuatorial, mientras que el resto de las especies se encuentran de manera natural en diferentes áreas de distribución (Figura 1).

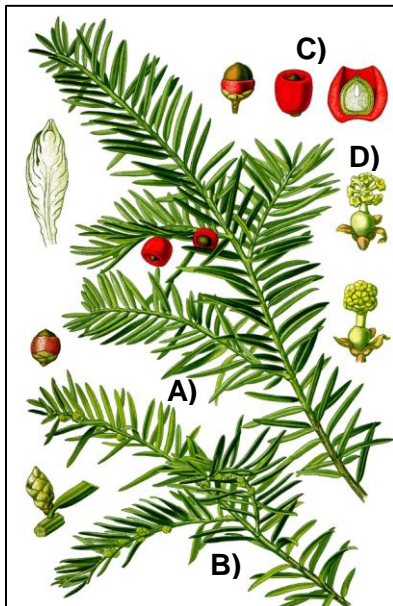


**Figura 1.** Distribución geográfica de las especies del género *Taxus* en el mundo.

### 2.1.1. Descripción botánica

Los árboles del género *Taxus* son dioicos, es decir que existen árboles hembras y machos, robustos y su follaje verde oscuro se mantiene durante todo el año y puede llegar hasta los 15 ó 20 metros de altura. Crecen en ambientes húmedos y frescos, principalmente en zonas montañosas. Su crecimiento es muy lento, necesita aproximadamente 100 años para que su tronco tenga 25 cm de diámetro y 9 metros de altura.

El árbol del tejo se caracteriza por poseer un tronco grueso, de hasta 1.5 metros de diámetro, con la corteza de color pardo-grisácea. Sus ramas son largas y crecen horizontalmente. Las hojas son numerosas, largas y estrechas, de color verde oscuro por el haz y más pálidas por el envés. Sus flores masculinas se agrupan en forma de espigas, mientras que las femeninas constan de un único ovario, sencillo, sin estilo ni estigma, rodeado en la base por un disco circular, que es el que dará lugar a la pulpa del fruto, el cual consta de una semilla simple, de forma ovalada, cubierta por una cúpula roja que recibe el nombre de arilo, abierta por el ápice, viscosa y carnosa en la madurez, hecho que sucede en el otoño (Figura 2).



**Figura 2.** Características morfológicas de las ramas de los árboles del género *Taxus*. A) Segmento de una rama con semillas, B) Segmento de una rama con estróbilos, C) Semillas y D) Estróbilos.  
<http://home.tiscali.nl/grensschap/Archeologie/eburonen.htm>.

## 2.1.2. Etnobotánica

### 2.1.2.1. Usos tradicionales y místicos.

Desde tiempos muy antiguos, el tejo era una especie muy apreciada por el hombre, particularmente por su madera de gran calidad, como por sus propiedades curativas y venenosas. El tejo formó parte de distintos rituales relacionados con la vida y la muerte, debido a la gran longevidad que tienen estos árboles. En Francia, Irlanda, Inglaterra, España y otros países, se plantaba en los cementerios donde según la leyenda, extendían una raíz hasta la boca de cada uno de los cadáveres y transportaban sus almas. Su poder tóxico se ha exagerado hasta tal punto que Dioscórides en su libro de plantas decía: “Tiene tanta vehemencia, que ofende gravemente a los que a su sombra duermen o asientan, y aún muchas veces los mata”. También los druidas irlandeses tenían un gran respeto al tejo porque creían que era eficaz contra las hadas y las brujas en ceremonias mágicas (Strobel et al. 1993). En el año 51 a.C., el emperador Julio César habla sobre este árbol en el sexto de sus libros titulado *De Bello Gálico*, en él explica que Catuvolcu, rey de los eburones confesó que: “preferiría morir envenenado por un tejo que rendirme frente a los romanos...” y se suicidó con un té de tejo para evitar caer bajo su poder (Nicolaou et al. 1996).

Las propiedades medicinales del árbol de tejo se han conocido durante siglos. En el noroeste de los Estados Unidos, las tribus nativas norteamericanas, tales como el Quinault, Multnomah y Nez Perce utilizan la corteza del tejo del Pacífico como desinfectante, abortivo y para el tratamiento de cáncer de piel (Nicolaou et al. 1996). Las decocciones de hojas de *Taxus baccata* se usaron ocasionalmente como antihelmíntico, contra reumatismos, artritis, afecciones hepáticas y molestias de las vías urinarias. Durante los siglos XVIII y XIX, la gente en Europa y la India usaba las decocciones de hojas como abortivo y emenagogo (Wilson et al. 2001). En homeopatía, las tinturas de tallos jóvenes y frutos han sido utilizadas para tratar el dolor de cabeza, neuralgias, cistitis, mala visión, gota, reumatismo y varias afecciones de corazón y riñones (Stohs, 2004). También se han usado como antimalárico, antirreumático, para tratamiento de la bronquitis y contra el asma (Küpeli et al. 2003).

### **2.1.3. Actividades biológicas de diferentes especies de *Taxus*.**

Se han desarrollado varios estudios con el objetivo de descubrir las propiedades curativas del tejo. Por ejemplo, en la medicina tradicional el tejo se ha usado para el tratamiento de alergias, se encontró que era debido a su actividad como inhibidor de la liberación de histamina (Koyama et al. 2006). Posee propiedades antiinflamatorias y propiedades anticonceptivas (Küpeli et al. 2003), anticonvulsivas y antipiréticas (Nisar et al. 2008a). El tejo también se ha usado para el tratamiento de heridas e infecciones de la piel y recientemente también se le han atribuido propiedades como antifúngico y antibacteriano (Nisar et al. 2008b). Además, se ha investigado el uso del tejo para el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica y se ha demostrado que el extracto acuoso de la corteza del tejo impidió la disminución de la masa ósea inducida por ovariectomía, especialmente en el hueso cortical, mediante la inhibición de su resorción (Yin et al. 2006).

Sin embargo, el género *Taxus* es muy conocido debido al gran interés que han despertado sus alcaloides diterpénicos, fundamentalmente el taxol, ya que es el compuesto más utilizado actualmente en la quimioterapia frente a diversos tipos de cáncer. Además de estos compuestos, el género *Taxus* es una fuente de compuestos con importante actividad biológica como los lignanos, flavonoides, esteroides y derivados glucosilados (Gurbuz et al. 2004), que entre sus numerosas aplicaciones destacan por su actividad antitumoral, antiinflamatoria, antioxidante y antitrombótica (Onrubia et al. 2010)

## 2.2. Taxol

### 2.2.1. Descubrimiento del taxol.

En 1955 el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), estableció el Cancer Chemotherapy National Service Center (CCNSC) para que actuara como un centro público para la búsqueda de compuestos antineoplásicos. Aunque la mayoría de los compuestos investigados era de origen sintético, Jonathan Hartwell, un químico que tenía experiencia en productos naturales, empezó a explorar el mundo de las plantas. Después de varios años de acuerdos informales, en 1960, el NCI encargó a botánicos del Departamento de Agricultura de América (USDA) recolectar muestras de plantas y comprobar sus propiedades anticancerígenas. En agosto de 1962, uno de los botánicos, Arthur S. Barclay, recogió 15 libras de ramas, agujas y corteza de *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico) y una vez procesado, se encontró que el material tenía actividad citotóxica en modelos *in vitro*. En 1963, fue el equipo de Monroe E. Wall quien descubrió que las extracciones realizadas a partir de la corteza de esta especie poseían cualidades antitumorales. Poco tiempo después, Wall y su colega Wani aislaron y purificaron los componentes para realizar estudios sobre su actividad en el Research Triangle Institute, en Carolina del Norte. En 1967 el equipo consiguió aislar el principio activo, y anunció su descubrimiento en la reunión de la Sociedad Química Americana en Miami Beach, Florida, EUA (Wani et al. 1971, Wall y Wani, 1996), dicho compuesto fue llamado "Taxol", haciendo referencia al nombre botánico del tejo, *Taxus*. De acuerdo con los resultados obtenidos, el NCI decidió apoyar el proyecto iniciado por Wall y Wani, los cuales publicaron en 1971 el aislamiento y la estructura química del taxol (Wani et al. 1971). Aunque la estructura era única entre los diferentes agentes anticancerígenos conocidos, su aislamiento fue recibido con muy poco entusiasmo, debido a que tenía dos graves problemas: era poco soluble en agua, por lo cual sería una droga difícil de formular y su obtención se daba en bajas concentraciones de una fuente no renovable, ya que la extracción del compuesto de la corteza interna del árbol implicaba su muerte (Kingston, 2000). A pesar de estos problemas, el NCI siguió recolectando más corteza de *Taxus* para seguir aislando taxol y continuar con los ensayos preclínicos a gran escala. En 1979, se recobró el interés por este fármaco con el descubrimiento de su mecanismo de acción en la estabilización de los microtúbulos. Estas investigaciones fueron llevadas a cabo por un grupo

de científicos dirigidos por la Dra. Susan Horwitz de la Facultad de Medicina Albert Einstein de Nueva York (Schiff et al. 1979). En 1982 se completaron los estudios preclínicos de formulación y toxicológicos. La Fase I de los estudios clínicos con taxol inició en 1983 y la Fase II en 1985; para 1989 se obtuvieron los primeros reportes de efectividad con 30% de respuestas globales en el rescate de pacientes enfermos con cáncer epitelial de ovario (McGuire et al. 1989). En consecuencia, en 1992 la Administración de Drogas y Alimentos de EUA (FDA) aprobó el uso clínico de Taxol® como marca registrada de Bristol-Myers Squibb® para el tratamiento de cáncer de ovario; posteriormente, la FDA amplió su aprobación de uso debido al éxito obtenido en las pruebas clínicas contra cáncer de mama, pulmón, vejiga, cérvico-uterino, melanomas y Sarcoma de Karposi (Markman et al. 1992; O'Shaughnessy y Cowan, 1994; Jennewein y Croteau, 2001). En 1994, la síntesis total del taxol fue desarrollada independientemente y por dos grupos de investigadores (Holton et al. 1994a, 1994b; Nicolaou et al. 1994).

El taxol se está estudiando actualmente para el tratamiento de enfermedades no relacionadas con el cáncer que requieren estabilización de los microtúbulos y evitar la proliferación celular y la angiogénesis, por ejemplo, psoriasis. Además, el taxol también está en estudio para el tratamiento de taupatías (afecciones en las proteínas tau), tales como el Alzheimer o el Parkinson ligados al cromosoma 17, entre otros (Malik et al. 2011).

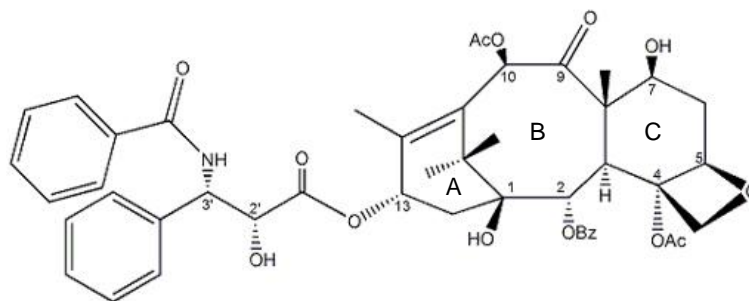
### **2.2.2. Estructura química del taxol.**

El taxol tiene una estructura química compleja, su fórmula química es  $C_{47}H_{51}NO_{14}$ , tiene un peso molecular de 853.9 Da y su nombre químico es: 5 $\beta$ ,20-epoxi-1,2 $\alpha$ ,4,7 $\beta$ ,13 $\alpha$ -hexahidroxitax-11-en-ona-4,10-diacetato-2-benzoato 13-ester unido a la cadena lateral (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserina.

Su estructura está dividida en dos partes: la cadena lateral y el esqueleto de taxano (Figura 3), el cual está constituido por el anillo A, B y C. Estos anillos tiene distintos grupos funcionales, incluyendo dos grupos OH, un grupo benzoilo, dos grupos acetilo y un anillo oxateno. Unido al C13 del esqueleto se localiza la cadena lateral o C13 (2'R,3'S)-N-benzoil-3'-fenilisoserina, con un hidroxilo y un grupo funcional de benzoilo (Guo et al. 2006; Malik et al. 2011). Los constituyentes más importantes de la molécula de taxol para la actividad



anticancerígena están presentes en el anillo A, en C2 con el grupo benzoil, el anillo oxatano y la cadena lateral (Malik et al. 2011).



**Figura 3.** Estructura química de la molécula de taxol.

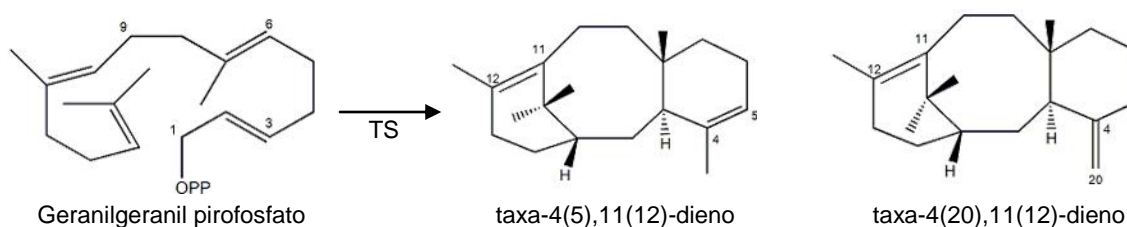
### 2.2.3. Avances en la biosíntesis del taxol.

En las últimas décadas, se han realizado importantes avances en el conocimiento de la ruta de biosíntesis del taxol y taxanos relacionados, mediante estudios metabólicos y genéticos, principalmente a partir de los estudios por cultivo *in vitro* de árboles de tejo. El taxol, por su condición de diterpeno, se forma a partir del geranilgeranil difosfato (GGPP), que se sintetiza a partir de tres moléculas de isopentil difosfato (IPP) y una de su isómero, el dimetilalil difosfato (DMAPP), por la acción de la enzima geranil difosfato sintasa. La síntesis de IPP tiene dos vías: en el citosol, la vía clásica que procede del mevalonato, el IPP se produce a partir de acetil coenzima A para la biosíntesis de esteroides, triterpenos y ciertos sesquiterpenos; en tanto que, en los plástidos, la vía alternativa del no mevalonato o metileritritol fosfato (MEP) que produce IPP y DMAPP a partir de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, está dirigida para la biosíntesis de monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (Expósito et al. 2009b).

Según Eisenreich et al. (1996), el IPP implicado en la biosíntesis del anillo de taxano está formado por la vía plastídica. Sin embargo, otros estudios (Lansing et al. 1991; Zamir et al. 1992) muestran que en plantas de *Taxus* suplementadas con mevalonato marcado, se obtienen cantidades significativas de taxol marcado radiactivamente. Srinivasan et al. (1996) sugirieron que el IPP formado a través de la ruta citosólica podría desempeñar un papel en la producción de taxol en la fase inicial del crecimiento de las células de *Taxus*, mientras que Wang et al. (2003) propusieron que la translocación de IPP a través de la membrana

plastídica sólo se produce durante la fase de crecimiento tardío del cultivo. Un estudio en cultivos de células *T. baccata* mostró que la adición de fosmidomicina (inhibidor de la ruta plastídica) en los cultivos, disminuye drásticamente la producción de taxol, mientras que la adición de mevinolina (inhibidor de la ruta citosólica), aunque se redujo, no afecta la producción. Esto demostró que el IPP usado para la formación del anillo del taxano es preferentemente formado en la vía plastídica (Cusidó et al. 2007).

La primera etapa específica en la síntesis de taxol, es la ciclación de GGPP a taxa-4(5),11(12)-dieno y taxa-4(20),11(12)-dieno (Figura 4), dos compuestos isómeros, reacción catalizada por la enzima taxadieno sintasa (TS), una proteína monomérica de 79kDa. La enzima se purificó y caracterizó en 1995 (Hezari et al. 1995) y el gen que codifica para TS se identificó y clonó en 1996 (Wildung y Croteau, 1996).

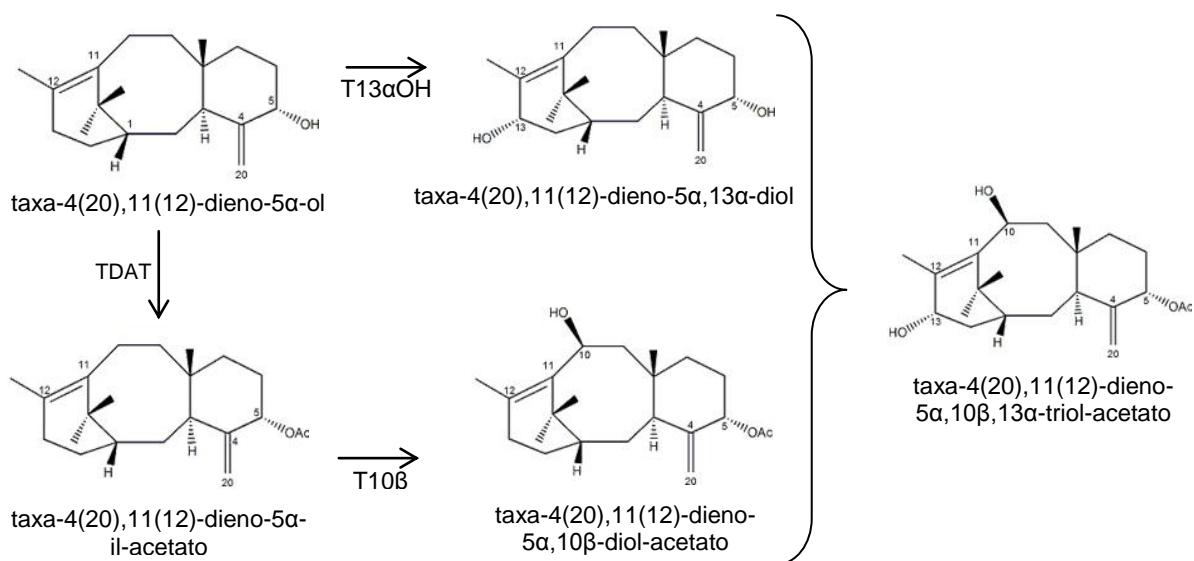


**Figura 4.** Ciclación de GGPP catalizado por la enzima taxadieno sintasa (TS) que produce dos compuestos isómeros de taxadieno.

El segundo paso específico en la biosíntesis de taxol es una hidroxilación, dependiente del citocromo P450 (citP540) en la posición C5, reacción catalizada por la enzima taxadieno-5 $\alpha$ -hidroxilasa (T5 $\alpha$ H) para formar taxa-4(20),11(12)-dieno-5 $\alpha$ -ol (Jennewein et al. 2004). Esta enzima, además de su actividad hidroxilante, continua con una restructuración alílica del doble enlace 4(5) a la posición 4(20) (Figura 5). Estos dos pasos metabólicos, ciclación y la hidroxilación, son lentos, pero no parecen ser limitante de la velocidad en la biosíntesis de taxol (Hefner et al. 1996).

En este punto de la biosíntesis hay una bifurcación y el sustrato puede ser modificado por una transferasa o una hidroxilasa (Figura 6). La enzima taxadieno-5 $\alpha$ -ol-O-acetil transferasa (TDAT) que carece del extremo N-terminal, acila la taxa-4(20),11(12)-dieno-5 $\alpha$ -ol en la posición C5 para formar el taxa-4(20),11(12)-dieno-5 $\alpha$ -il-acetato (Walker and Croteau,

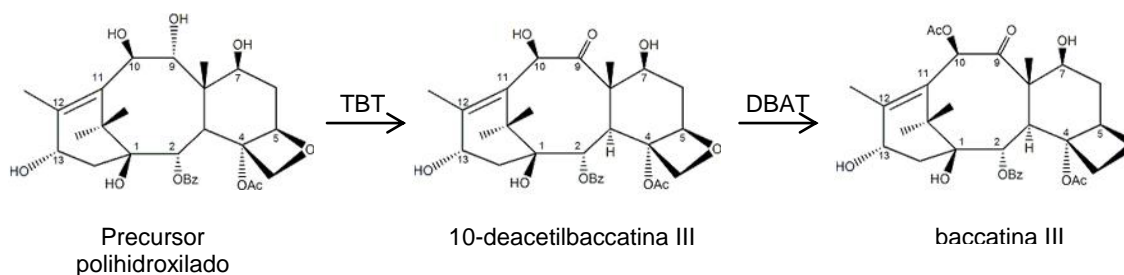




**Figura 6.** Primera bifurcación de la ruta de biosíntesis de taxol. El taxa-4(20),11(12)-dieno-5α-ol puede ser modificado por TDAT o T13αOH. Tras la acilación, este sustrato puede ser modificado por otras hidroxilasas.

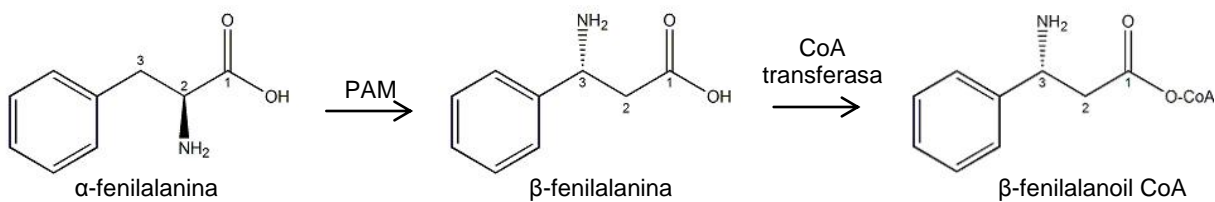
Aunque se han propuesto diferentes mecanismos para la formación del anillo de oxetano (Floss y Mocek, 1995; Croteau et al. 2006), actualmente se acepta que el proceso implica la epoxidación del doble enlace 4(20), seguido por la migración del grupo α-acetoxi de la posición C5 a la C4 junto con la expansión del oxirano a grupo oxetano. La enzima que epoxida el doble enlace C4-C20 aún no se ha caracterizado funcionalmente y la expansión del anillo de oxirano a oxetano es también un paso que no se conoce completamente.

Después de la posible formación del precursor polihidroxlado por la actividad de la enzima taxano-2α-O-benzoil transferasa (TBT) (Walker y Croteau, 2000a), el siguiente compuesto obtenido es la 10-deacetilbaccatina III (10-DB III). A continuación, se produce la acetilación del hidroxilo en la posición C10 de la 10-DAB dando lugar a la baccatina III por acción de la enzima 10-deacetilbaccatina III-10-O-acetil transferasa (DBAT) (Walker y Croteau, 2000b). Este paso conduce a la formación de un diterpeno intermedio, baccatina III, utilizando 10-DB III y acetil CoA como sustratos (Figura 7).



**Figura 7.** Formación de 10-deacetilbaccatina III y la baccatina III a partir del precursor polihidroxiado.

Tras la formación de la baccatina III, tiene lugar la esterificación del grupo hidroxilo en la posición C13 con la cadena lateral  $\beta$ -fenilalanoil-CoA, un paso esencial en la biosíntesis de taxol. La cadena lateral se obtiene a partir del aminoácido  $\alpha$ -fenilalanina por la acción de la enzima fenilalanina aminomutasa (PAM) (Floss y Mocek, 1995) (Figura 8). Un éster-CoA ligasa desconocido probablemente activa el compuesto por lo que se puede unir a baccatina III. La unión de la cadena lateral transcurre con una esterificación inicial del hidroxilo del C13 con  $\beta$ -fenilalanina-CoA para dar el 3'-N-debenzoil-2'-deoxitaxol, mediante la acción de la enzima taxano-C13-O-fenilpropanoil-CoA transferasa (BAPT) (Figure 9) (Walker et al. 2002a).



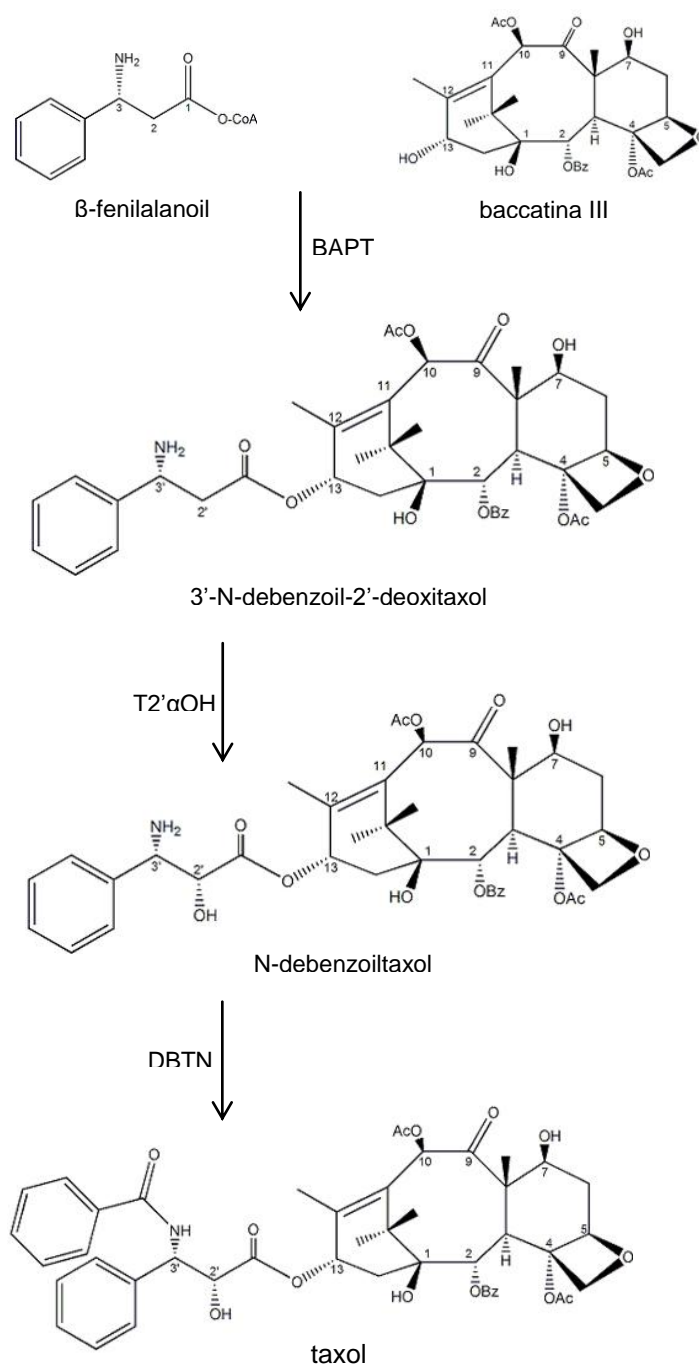
**Figura 8.** Síntesis de  $\beta$ -fenilalanina CoA a partir de  $\alpha$ -fenilalanina.

Aunque C13-transferasa puede enlazar  $\beta$ -fenilalanina y  $\beta$ -fenilisoserina, se cree que el desconocido taxano-2' $\alpha$ -hidroxilasa actúa en este penúltimo punto (Figura 9). La hidroxilasa, que participa en la formación de la cadena lateral, se asemeja a otras taxano hidroxilasas y se puede asumir que pertenece a la familia de las citP450.

De acuerdo con los estudios realizados por Long y Croteau (2005) y Long et al. (2008), parece que la N-benzoil transferasa (DBTNBT) es responsable de la última etapa que conduce a la síntesis del taxol a partir de N-debenzoiltaxol (Figura 9), ya que no hay evidencia de hidroxilación directa de  $\beta$ -fenilalanina en la posición 2' o en 2'-deoxitaxol, mientras que 3'-N-desbenzoil-2'-deoxitaxol puede ser hidroxilado en la posición 2 de la cadena lateral.

Por otra parte, DBTNBT prefiere N-debenzoiltaxol sobre N-debenzoil- 2'-deoxitaxol por un factor de eficiencia catalítica de dos. DBTNBT es una proteína cuya secuencia de aminoácidos presenta homología con otras aciltransferasas de *Taxus* (Walker et al. 2002b). Si otras transferasas o enzimas modifican N-debenzoiltaxol, o incluso el mismo taxol, puede dar lugar a la producción otros compuestos, como cefalomanina o 10-desacetiltaxol.

Actualmente, la mayoría de las enzimas de la biosíntesis de taxol han sido secuenciadas, clonadas y caracterizadas, pero algunas de ellas siguen sin conocerse (Tabla 1).



**Figura 9.** Etapa final de la biosíntesis del taxol a partir de baccatina III. Esterificación de C13 por BAPT, hidroxilación en C2' por una hidroxilasa desconocida y benzoilación en C3' por DBTNBT.

**Tabla 1.** Lista de las enzimas conocidas que participan en la biosíntesis de taxol. Abreviatura asociada y publicación en la que aparecieron clonados los genes por primera vez.

<b>Enzimas de la biosíntesis de taxol</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Publicación</b>
geranilgeranil difosfato sintasa	GGPPS	Hefner et al. 1998
taxadieno sintasa	TS	Wildung y Croteau, 1996
taxadieno-5 $\alpha$ -hidroxilasa	T5 $\alpha$ OH	Jennewein et al. 2004
taxadieno-13 $\alpha$ -hidroxilasa	T13 $\alpha$ OH	Jennewein et al. 2001
taxa-4(20),11(12)-dieno-5 $\alpha$ -ol- O-acetil transferasa	TDAT	Walker et al. 2000
taxano-10 $\beta$ -hidroxilasa	T10 $\beta$ OH	Schoendorf et al. 2000
taxano-14 $\beta$ -hidroxilasa	T14 $\beta$ OH	Jennewein et al. 2003
taxano-2 $\alpha$ -hidroxilasa	T2 $\alpha$ OH	Chau y Croteau, 2004
taxano-7 $\beta$ -hidroxilasa	T7 $\beta$ OH	Chau et al. 2004
taxano-1 $\beta$ -hidroxilasa	T1 $\beta$ OH	?
C4,C20-epoxidasa	-	?
Oxomutasa	-	?
taxano-2 $\alpha$ -O-benzoil transferasa	TBT	Walker y Croteau, 2000a
10-deacetilbaccatina III-10- O-acetil trasnferasa	DBAT	Walker y Croteau, 2000b
taxano-9 $\alpha$ -hidroxilasa	T9 $\alpha$ OH	?
fenilalanina aminomutasa	PAM	Walker et al. 2004
baccatina III: 3-amino-3-fenilpropanoil transferasa (taxano-C13- O-fenilpropanoil- CoA trasnferasa)	BAPT	Walker et al. 2002a
2' $\alpha$ -hidroxilasa	-	?
3'-N-benzoil-2'-deoxitaxol N-benzoil transferasa	DBTNBT	Walker et al. 2002b



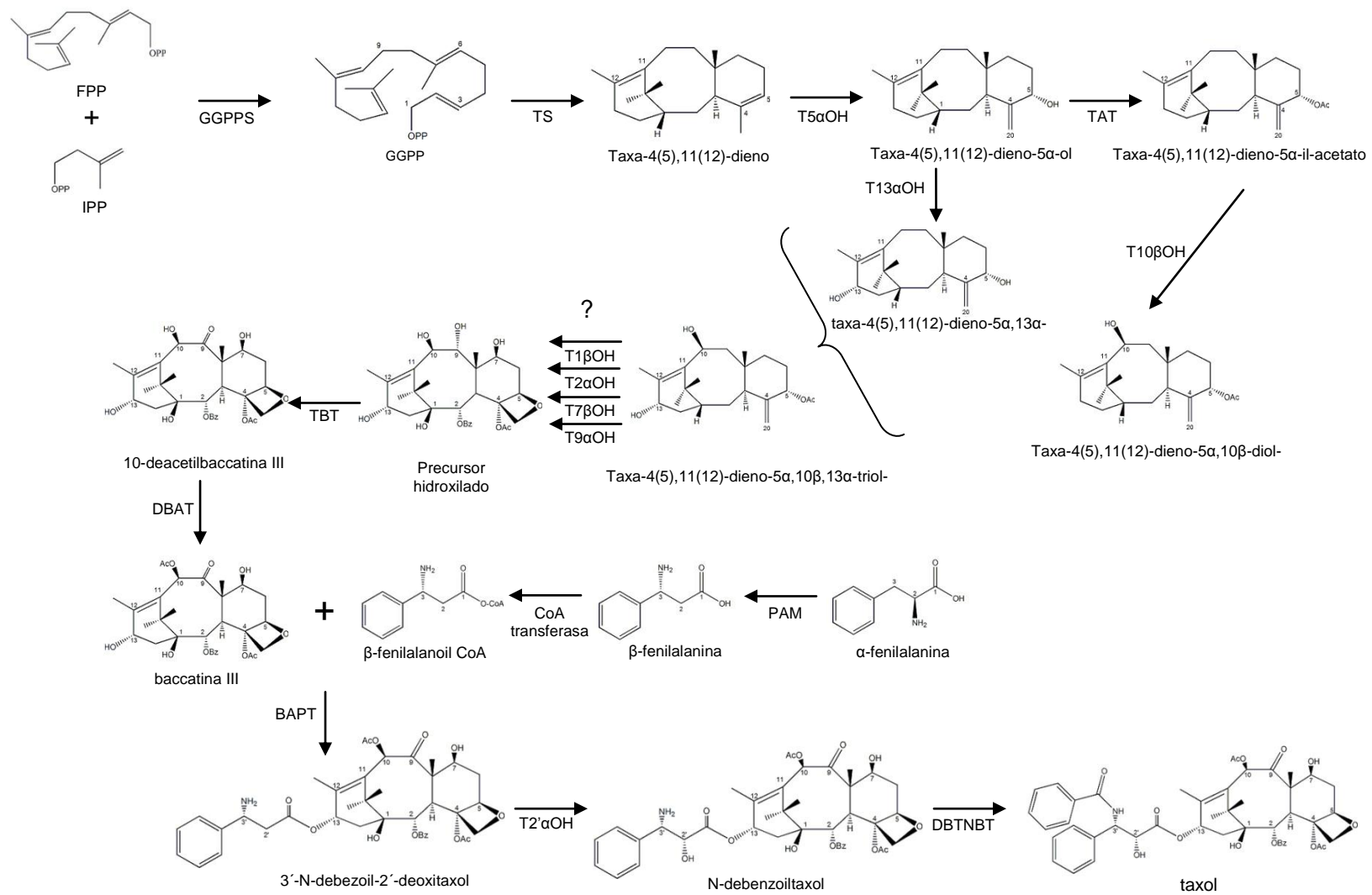


Figura 10. Ruta general de biosíntesis de taxol.

## 2.2.4. Mecanismo de acción del taxol

En 1979 Horwitz y colaboradores describieron que el taxol presentaba un mecanismo de acción único en células cancerígenas. Esto despertó gran interés farmacológico debido a su potencial antimitótico, el cual se basa en la estabilización de los microtúbulos del citoesqueleto (Schiff y Horwitz, 1979; 1980). Los microtúbulos están compuestos por dímeros de  $\alpha$  tubulina y  $\beta$  tubulina, que a su vez se polimerizan formando protofilamentos, la polimerización ocurre mediante la hidrólisis de guanosin trifosfato (GTP) a guanosin difosfato (GDP) (Magnani et al. 2009). La función de los microtúbulos en las células es de gran importancia ya que participan en la división celular (mitosis) (Jordan y Wilson, 2004). Esta característica y su participación en la división celular ha hecho que sean blanco de diferentes antimitóticos, los cuales son clasificados en dos grupos: agentes que inhiben la polimerización de los microtúbulos al unirse a los dímeros de tubulina y el segundo grupo son agentes que estabilizan la polimerización de los microtúbulos durante la división celular.

El taxol es un potente inhibidor de la proliferación celular, que a diferencia de otros anticancerígenos como la vinblastina y vincristina que se unen a los dímeros de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ , éste se une específicamente a la sub unidad  $\beta$  impidiendo la hidrólisis de GTP para aumentar la polimerización del protofilamento (Figura 11), interrumpiendo la dinámica de despolimerización (Mangnani et al. 2009). Esta acción bloquea la división durante la mitosis e inhibe la proliferación celular (Snyder et al. 2001).



**Figura 11.** Mecanismo de acción del taxol.

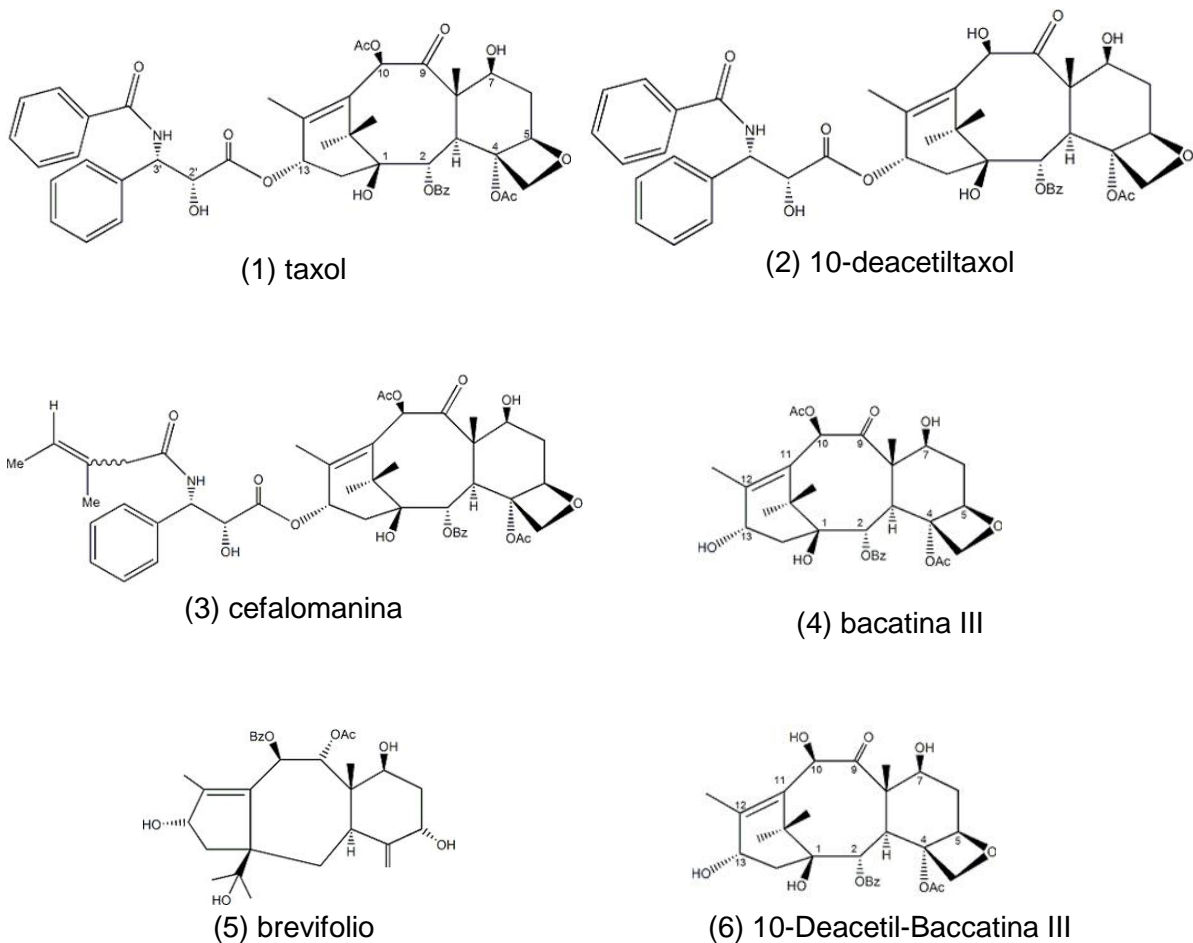
### 2.2.5. Problemática para el abastecimiento de taxol a partir de fuentes naturales.

La obtención de altas cantidades de taxol a partir de la especie silvestre de *Taxus brevifolia*, presentó una gran problemática, debido al bajo rendimiento que se obtiene en el proceso de extracción de la corteza aunado a que ésta especie es de crecimiento muy lento. Por lo que se buscaron otras fuentes de obtención de taxol que fueran viables y sustentables, es así como se estudiaron otras especies del género *Taxus*, como son el tejo europeo *T. baccata* (Bentebibel et al. 2005); el tejo canadiense *T. canadensis* (Zamir et al. 1992; Roberts et al. 2003); el tejo japonés *T. cuspidata* (Fett-Neto y DiCosmo, 1992); el tejo chino *T. chinensis* (Xu y Liu, 1989), *T. wallichiana* (Miller et al. 1981) y *T. yunnanensis* (Chen et al. 1991), así como el tejo mexicano *T. globosa* (Soto et al. 2000), entre otros.

Para fines de comercialización del taxol, la obtención a partir de la corteza interna, es poco viable debido a las concentraciones mínimas de este metabolito que es transportado por el floema y que se acumula principalmente en corteza en concentraciones de 0.01 a 0.03% del peso seco de tejido vegetal; lo anterior se traduce en que para la obtención de 1Kg de taxol se requiere de 9,000 Kg de corteza seca proveniente de 2,000-3,000 árboles adultos. Bajo este esquema, el medicamento para tratar a un solo paciente requeriría de 5-6 árboles de 100 años de edad cada uno.

Actualmente, Bristol-Myers Squibb produce taxol por vía semisintética a partir de 10-deacetilbaccatina III, análogo estructural de taxol no citotóxico obtenido a partir de ápices de *T. baccata*, utilizando el procedimiento desarrollado por Holton et al. (1994 a y b) que permite la esterificación de este precursor a nivel de C10 y C13 para obtener el taxol; la razón de haber seleccionado la 10-deacetilbaccatina III (6) se debe a que se encuentra en mayor concentración en los extractos de *T. baccata* a la cual es relativamente fácil de realizar las modificaciones químicas necesarias.

Entre los análogos de taxol obtenidos de los extractos de árboles del género *Taxus*, sólo los que poseen el éster en el C13 presentan importante actividad citotóxica como son: taxol (1), 10-deacetiltaxol (2) y cefalomanina (3) (Swindell et al. 1991) (Figura 12).



**Figura 12.** Estructura química del taxol y 5 taxanos relacionados (van Rozendaal et al. 2000).

### 2.2.6. Fuentes alternas para la obtención y producción de taxol.

La semisíntesis química, partiendo de los precursores 10-deacetilbaccatina III y baccatina III, es un proceso de alto costo, debido a que la purificación de los precursores a partir de las hojas se dificulta por la presencia de otros metabolitos sintetizados, lo cual ha hecho que el precio en el mercado no sea accesible para la mayoría de los pacientes con cáncer.

Otras de las alternativas para la obtención de taxol es la búsqueda de organismos con capacidad de sintetizarlo, por ejemplo: hongos endofíticos de las especies de *Taxus*. La desventaja de los hongos como fuente alterna es la baja producción y alta variabilidad en las concentraciones de taxol, esto ha ocasionado que la mayoría de los hongos reportados no puedan ser usados comercialmente para la producción de taxol y taxanos relacionados (Guo et al. 2006). Hasta 1998 los hongos fueron considerados como la única fuente alterna para la producción de taxol, pero Bestoso et al. (2006) reportaron la producción de taxol en cultivos celulares de *Corylus avellana* (avellana).

Además de utilizar otros organismos como fuente alterna para obtener y producir taxol se ha recurrido a la ingeniería metabólica y manipulación genética en bacterias; uno de los primeros estudios desarrollados a partir de esta herramienta biotecnológica fue la realizada por Huang et al. (2001) en *Escherichia coli*, en la que se integraron dos genes (el gen *ggpps* que codifica para la enzima GGPPS y el gen *ts* que codifica para la enzima TS) al genoma de la bacteria para la producción de taxol. También Besumbes et al. (2004) transformaron *Arabidopsis thaliana* con el gen *ts*, obteniendo plantas transgénicas productoras de taxol. Estas investigaciones demuestran que el conocimiento de los genes que codifican para enzimas importantes dentro de la ruta de síntesis, permite el desarrollo de nuevas fuentes de obtención.

Otra de las alternativas utilizadas para la obtención y producción de taxol son los cultivos celulares *in vitro*, los cuales se han considerado a la fecha como la mejor estrategia por la FDA, debido a que los cultivos celulares proveen una fuente sustentable del compuesto además de que se puede producir el compuesto a gran escala (Nims et al., 2006).

### **2.3. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.**

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales comprende una serie de técnicas fundamentadas en la totipotencialidad celular vegetal para controlar los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos de células o tejidos vegetales, bajo condiciones asépticas, medios nutritivos artificiales y específicos y condiciones ambientales controladas (Abdelnour-Ezquivel y Vicent, 1994).

Dentro de los cultivos de tejidos vegetales, los procesos morfogénéticos o morfogénesis, pueden presentarse por medio de dos vías, la morfogénesis directa y la indirecta. La morfogénesis directa, se refiere al cultivo de órganos o secciones de una planta que pueden generar otros órganos o una planta completa directamente a partir de un explante. Por su parte, la vía indirecta se caracteriza por presentar una fase de callo o material vegetal desdiferenciado entre la etapa inicial de explante y la formación de estructuras vegetales.

#### **2.3.1. Establecimiento de cultivos vegetales.**

En el establecimiento de cultivos de tejidos vegetales se deben considerar tres aspectos importantes:

- 1) *Tipo de explante.* Se deben seleccionar los tejidos que tengan crecimiento rápido o que se encuentre en estadios tempranos de su desarrollo. Los explantes seleccionados deben manipularse en forma estéril y sembrarse en medios ricos de nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo celular. Con frecuencia se utilizan: cotiledones, hipocótilos, raíces primarias y protoplastos.
- 2) *Formulación y condiciones del medio de cultivos.* El crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro* depende de la información genética de la planta y de un número complejo de factores externos, entre ellos los macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento celular como son N, P, K, Mg, Fe, B, Zn, Mo y Mn. Los factores físicos como la luz, temperatura, pH y concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> son esenciales para

el desarrollo de un cultivo, así como el tipo y concentración de reguladores de crecimiento como las auxinas y citocininas.

- 3) *Tipo de cultivo*. Entre los tipos de cultivos vegetales que se pueden establecer en condiciones *in vitro* se puede mencionar los cultivos de órganos, callos, protoplastos y células en suspensión.

### **2.3.2. Establecimiento de los cultivos de callo.**

La formación de callo es una respuesta natural a las heridas en algún órgano de la planta, el cual consiste en un incremento en la división celular de forma desorganizada (Smith, 1986). Este tipo de formaciones puede ser producido *in vitro* por medio de ciertos reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) en el medio de cultivo.

Los cultivos de callos se pueden iniciar a partir de diferentes explantes (hipocótilo, cotiledón, meristemo apical o axilar, hoja y tallo), realizando un corte que provoque una lesión y la iniciación de la división celular. Cuando las células están asociadas en forma laxa, morfológicamente se dice que el callo es friable y sus células se pueden disgregar fácilmente. Este tipo de callos se prefieren para iniciar los cultivos de células en suspensión.

### **2.3.3. Establecimiento de los cultivos de células en suspensión.**

Los cultivos de células en suspensión habitualmente se establecen a partir de tejidos desdiferenciados (callos) que provienen de tejidos diferenciados o bien a partir de tejidos meristemáticos. Los callos se prefieren morfológicamente friables y se transfieren a medios nutritivos líquidos. Las suspensiones celulares deben mantenerse en agitación constante para asegurar la dispersión celular y una adecuada aireación o intercambio de gases.

Los cultivos de células en suspensión representan una mejor opción en la producción de metabolitos secundarios, incluso sobre el cultivo de callos. Los cultivos de células en suspensión presentan tiempos de duplicación menores y productividad mayor y que debido a

las condiciones de cultivo controladas, esta producción es independiente de los cambios ambientales a las que están sujetas las plantas en su habitat.

#### **2.3.4. Estrategias biotecnológicas para incrementar el metabolismo secundario en los cultivos *in vitro*.**

Con la finalidad de incrementar la producción y la concentración de los metabolitos secundarios en los cultivos de células existen diferentes estrategias biotecnológicas como son: 1) selección de líneas hiperproductoras, 2) tipo de cultivo, 3) diseño o formulación de medios de cultivo, 4) uso de estimuladores, 5) adicción de precursores, 6) transformación genética, 7) inmovilización celular, 8) formatos de procesos y 9) escalamiento a bioreactor.

1) La selección de líneas hiperproductoras es importante para asegurar el éxito de los cultivos, se seleccionan considerando las condiciones del cultivo, rendimiento y productividad de los metabolitos de interés, es decir, que presenten altos rendimientos de manera constante y estabilidad celular.

2) Los tipos de cultivos pueden ser de cultivos diferenciados (embriones, anteras y raíces normales o transformadas) o cultivos desdiferenciados (callos y células en suspensión). Se ha observado que el tipo de cultivo debe seleccionarse con especial interés, ya que muchas veces la producción se ve favorecida por el tipo de cultivo en el que se establezcan las líneas celulares.

3) Cuando se desea incrementar el metabolismo secundario, la formulación adecuada de los medios de cultivo para cada especie es muy importante. Se ha visto que la manipulación de algunos factores favorecen la producción; por ejemplo, el aumento de la fuente de carbono (Feria-Romero et al. 2005; Luna-Palencia et al. 2005) o la variación en las concentraciones de nitratos y fosfato (Osuna et al. 2014).

4) En la actualidad son ampliamente utilizados estimuladores tanto bióticos (jasmonato de metilo, ácido araquidónico, celulasa, además de pequeños fragmentos de componentes celulares de diversos patógenos como hongos y bacterias, entre otros), como abióticos ( pH, luz UV, intensidad luminosa, agitación mecánica, temperatura, variación en la concentración



de diferentes nutrientes, entre otros) que estimulan la biosíntesis de compuestos con importancia económica, así como también inducen la formación de nuevos compuestos (Payne *et al*, 1992; Constabel y Kurtz, 1996).

5) La adición de precursores y la inducción de la biotransformación de los metabolitos secundarios son dos formas alternativas de estimular la producción. Estas estrategias han inducido la formación de productos deseados por su alto valor agregado, que se añaden al medio de cultivo (Wink, 1999) y que han favorecido además la producción de nuevos compuestos con importancia farmacológica.

6) La transformación genética es una herramienta biotecnológica muy importante, y se refiere a la inserción de genes ajenos al genoma de la célula vegetal huésped. La inserción puede ser directa (utilizando vectores como *Agrobacterium* sp., ADN de virus) o indirecta (transferencia de genes a los protoplastos, microinyección de ADN). El cultivo de raíces ha sido uno de los cultivos de órganos más utilizados en la transformación genética.

7) La inmovilización celular se refiere al encapsulamiento o atrapamiento de las células dentro de una partícula inerte bajo condiciones que favorecen el incremento de metabolitos secundarios, así como su excreción al medio de cultivos, se utiliza principalmente cuando se desea su producción a gran escala.

8) Para designar el formato del proceso que estaría determinado de acuerdo a como están creciendo las células, se necesita tomar en cuenta el tipo y cinética de producción de los compuestos para seleccionar así el modo de operación, si está asociado al crecimiento o no, o si se utilizan células en suspensión (libres o inmovilizadas) u órganos (Scragg, 1994, 1995). Dentro de los sistemas de producción en cultivos *in vitro* se conoce los cultivos tipo lote, cultivo lote extendido, cultivo semicontinuo, cultivo continuo y el cultivo tipo lote en dos fases.

9) Una vez optimizadas las condiciones de cultivo y los factores ambientales y físicos, el siguiente paso es llegar a una producción a gran escala de compuestos secundarios de alto valor comercial mediante la utilización de biorreactores, los cuales permiten un mejor control de las condiciones de cultivo.

### 2.3.5. Estimulación.

En la naturaleza las plantas sintetizan metabolitos secundarios en respuesta al ataque de herbívoros o patógenos, este hecho desencadena una cascada de señalización, por medio de moléculas que reaccionan con receptores específicos, para transmitir la información, este hecho favorece el incremento de la síntesis de metabolitos secundarios. De igual manera en los cultivos *in vitro* de células vegetales se puede inducir la síntesis de metabolitos secundarios utilizando estimuladores como el jasmonato de metilo (Cheong y Choi, 2003). Los estimuladores se clasifican de acuerdo a su naturaleza en bióticos (quitosano, jasmonato de metilo, alginato, cloruro de clorocolina entre otros) y abióticos (luz, estrés térmico, osmótico, presión, oxígeno, pH) (Zhong, 2002).

Los jasmonatos conforman un grupo de numerosos compuestos precursores o derivados del ácido jasmónico (JA) que ocurren naturalmente en el Reino Plantae, poseen actividad biológica y por ser derivados de ácidos grasos poliinsaturados forman parte del grupo de oxilipinas (Wasternac, 2007). El jasmonato de metilo (MeJ) fue aislado de *Jasminum grandiflorum*, este compuesto al igual que todos los de la familia de los jasmonatos, tienen un papel dentro de las respuestas al estrés y defensa, también se ha comprobado que pueden modular procesos como la viabilidad del polen y la maduración de frutos (Wasternac, 2007).

Su síntesis es por medio de la ruta octadecanoide, partiendo del ácido linoleico proveniente de las membranas celulares hasta la formación de ácido jasmónico el cual sufre una sustitución en el segundo carbono por la enzima ácido jasmónico carboxil metiltransferasa (JMT) para formar el jasmonato de metilo (Cheong y Choi, 2003). Los jasmonatos, principalmente el jasmonato de metilo, son de los más utilizados en los cultivos en suspensión de especies del género *Taxus* para favorecer la síntesis de taxol y otros taxanos (Hu et al. 2006).

El ión calcio ha sido utilizado en los cultivos de células en suspensión solo o en combinación con otros estimuladores principalmente con el MeJ (Zhao y Sakai, 2003; Lee-Parson y Erturk, 2005). El calcio citoplasmático juega un papel importante ya que interviene en los mecanismos de defensa en las plantas, actuando a nivel de varios sistemas de

señalización en la transducción en diferentes sistemas membranales (membrana celular, en vacuolas y plastos, así como en retículo endoplasmático) (Sanders et al. 1999). Por su estereoquímica el calcio es un excelente mensajero que induce importantes cambios conformacionales que explican su papel como estimulador cuando es añadido al medio de cultivo (Sanders et al. 1999; Zhao y Saki 2003), otra de sus actividades es a nivel enzimático por ejemplo: manteniendo la actividad catalítica de las peroxidasas y de las ATPasas; en altas concentraciones el ión calcio estimula en el retículo endoplasmático la producción de proteínas con actividad secretora (Sanders et al. 1999; Piñol et al. 1999).

### **2.3.6. Inmovilización celular.**

La inmovilización celular se refiere al encapsulamiento o atrapamiento de las células dentro de partículas inertes bajo condiciones que favorecen el incremento de metabolitos secundarios, así como su excreción al medio; se utiliza principalmente cuando se desea una producción de metabolitos secundarios a gran escala. Para su inmovilización, las células son “entrampadas” densamente en geles de carbohidratos o bien sembradas en soportes de polímeros rígidos, ocupando las células al crecer *in situ* la matriz formada por las partículas del soporte (Brodelius y Nilson, 1983; Yeoman et al. 1990). En ambos casos, las células inmovilizadas se hallan en un microambiente que difiere significativamente de aquel que existe en torno a ellas en una fase líquida, logrando que las células crezcan en forma de agregados celulares atrapadas entre los espacios comprendidos entre las membranas de las fibras, en donde existe el paso libre del medio líquido del cultivo a las células. Inicialmente fue utilizada en microorganismos, actualmente se ha aplicado con gran éxito al cultivo de células vegetales.

Con relación a los cultivos de células en suspensión, los cultivos de células inmovilizadas presentan una serie de ventajas, entre ellas se pueden destacar:

- La inmovilización es compatible con la producción de compuestos no asociados al crecimiento. Esto constituye una importante ventaja para los cultivos de células vegetales, puesto que la síntesis de metabolitos secundarios durante un sistema de cultivo discontinuo suele ir vinculada a la paulatina reducción o cese de su crecimiento.

- Las fases de crecimiento y de producción de metabolitos están desacopladas. Por ello la biomasa celular puede ser reutilizada de forma continua, no constituyendo un problema el lento crecimiento de las células.
- Las células inmovilizadas son capaces de mantener la viabilidad y la capacidad biosintética durante prolongados periodos de cultivo y están protegidas del estrés mecánico.
- Otras estrategias para el incremento de la productividad no sólo son compatibles, sino que pueden actuar sinérgicamente con la inmovilización. Estas estrategias incluyen la utilización de un medio de producción, la separación *in situ* del producto, el tratamiento con estimuladores y la adición de precursores biosintéticos.

También, con relación a los cultivos de células en suspensión, la inmovilización celular presenta desventajas, entre ellas son de destacar:

- El hecho de que el proceso de la inmovilización por sí mismo representa un coste añadido con relación al cultivo de las células en suspensión y la limitación en la proporción de biomasa celular que realmente se puede inmovilizar.
- La idea de que es posible una alta densidad celular en los diferentes sistemas de inmovilización, no es aplicable en el caso de las células vegetales. Con relativa frecuencia los cultivos de células vegetales en suspensión presentan una mayor densidad celular que la observada en los de células inmovilizadas.

Por otra parte, para que la inmovilización de una determinada suspensión celular resulte en el deseado incremento de los compuestos de interés, además de la conveniencia de que la formación de los metabolitos secundarios no debería estar asociada al crecimiento, se deben cumplir los siguientes requisitos:

- El crecimiento debería suprimirse para evitar la desintegración del sustrato de inmovilización y la eventual interrupción del proceso.
- Las células deberían mantener durante prolongados períodos de cultivo, un alto porcentaje de viabilidad y una alta capacidad para formar los productos de interés.
- Por lo menos debería producirse una parcial liberación del producto al medio. La liberación del producto al medio de cultivo de forma natural o provocada, es necesaria para poder desarrollar el proceso de inmovilización celular de forma efectiva.

### **2.3.7. Cultivo *in vitro* de diferentes especies del género *Taxus*.**

Con la finalidad de obtener otras fuentes de taxol así como de sus precursores, se han establecido los cultivos *in vitro* de diferentes especies de *Taxus*. La posibilidad de obtener taxol mediante cultivos *in vitro* inició en los años 90, donde se crearon los primeros cultivos de callos y posteriormente, los cultivos de células en suspensión de especies de *Taxus*, estableciéndose los principales medios para la inducción de callo a partir de hoja, tallo y corteza. Con estas investigaciones, se demostró que los cultivos celulares de diversas especies de *Taxus* son capaces de producir taxol y baccatina III en cantidades parecidas a las obtenidas en condiciones naturales (Fett-Neto y DiCosmo, 1992).

A partir del establecimiento de cultivos celulares *in vitro* se han desarrollado cultivos a nivel biorreactor en condiciones de laboratorio. Navia-Osorio et al. en el año 2002a y b, obtuvieron taxol y baccatina III a partir de cultivos celulares de *T. wallichiana* en biorreactor air-lift de 20 L.

También se han empleado diferentes estrategias como es la inmovilización de células de *Taxus*, en las que se han utilizado malla de nylon (Seki et al. 1997) y perlas de alginato de calcio (Bentebibel et al. 2005; Bonfill et al. 2006). Otra estrategia para incrementar la producción de taxol y taxanos relacionados en cultivos celulares de *Taxus*, ha sido la adición de estimuladores. Yukimune y su grupo de investigación en 1996 fueron los primeros que observaron el incremento de la producción de taxol en cultivos celulares de *T. x media* al ser tratados con jasmonato de metilo, por lo que a partir de esta investigación se ha utilizado para optimizar la producción de taxanos en otras especies del género *Taxus*: *T. x media* (Bonfill et al. 2003), *T. chinensis* (Wang et al. 2004), *T. baccata* (Bonfill et al. 2007) y *T. cuspidata* (Yang et al. 2008).

## 2.4. Antecedentes generales de *Taxus globosa* Schtdl.

### 2.4.1. Descripción Botánica de *T. globosa*.

Conocido comúnmente como tejo mexicano, romerillo, granillo, palmira y tlascatl, pertenece a la familia Taxaceae. La especie fue descrita por Schelectendal en 1938 pero no existe documentación de ello. Es un árbol dioico que mide de 6 a 12 m de alto, con un tronco muy ramificado y corteza escamosa de color café claro (Figura 13). Hojas jóvenes distribuidas en espiral y cuando maduran se disponen aplanadas, lineares hasta 3.5 cm de largo con el extremo terminal agudo y la base angostada en un pecíolo corto, con los márgenes ligeramente enrollados hacia arriba, verde oscuras en el haz y más claras en el envés. Conos masculinos axilares, en la parte inferior de las ramillas. Conos femeninos solitarios en las axilas de las hojas, rodeados por varias brácteas membranosas de color verde. Semillas ovoides de 6 a 7 mm de ancho, cubiertas parcialmente por un arilo carnoso de color rojo (Zamudio, 1992).

Reino: Plantae  
División: Coniferophyta  
Clase: Taxopsida  
Orden: Taxales  
Familia: Taxaceae  
Género: *Taxus*  
Especie: *T. globosa*

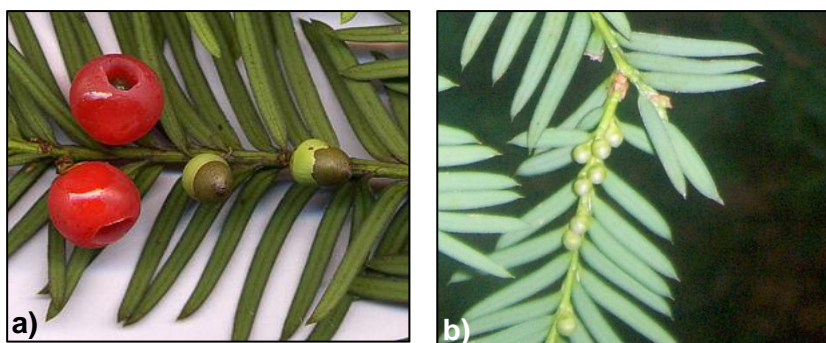


**Figura 13.** Ramas del árbol de *T. globosa* silvestre, foto tomada en el Estado de Hidalgo (Tapia, 2010).

Es extremadamente rara en cultivo; florece de enero a marzo y fructifica de mayo a noviembre; su regeneración natural se basa en las semillas; aunque produce brotes del tallo, lo que puede ser un potencial de propagación vegetativa importante. Es un árbol venenoso, excepto el arilo, el cual es atractivo y comestible para aves.

#### 2.4.2. Características distintivas.

*T. globosa* anteriormente fue descrita como una subespecie de *T. baccata* L, pero en la actualidad se considera a las especies americanas como entidades independientes de la europea, debido principalmente a sus diferencias en hábitat y el aislamiento geográfico. *T. globosa* se distingue por tener: hojas más largas y delgadas, dobladas hacia un lado y el extremo terminal agudo, así como semillas ovoides y gruesas (Zavala-Chávez et al. 2001; Zavala-Chávez, 2002) (Figura 14).



**Figura 14.** a) Estróbilos femeninos (semillas) y b) Estróbilos masculinos de árbol de *T. globosa* silvestre, (Tapia, 2010).

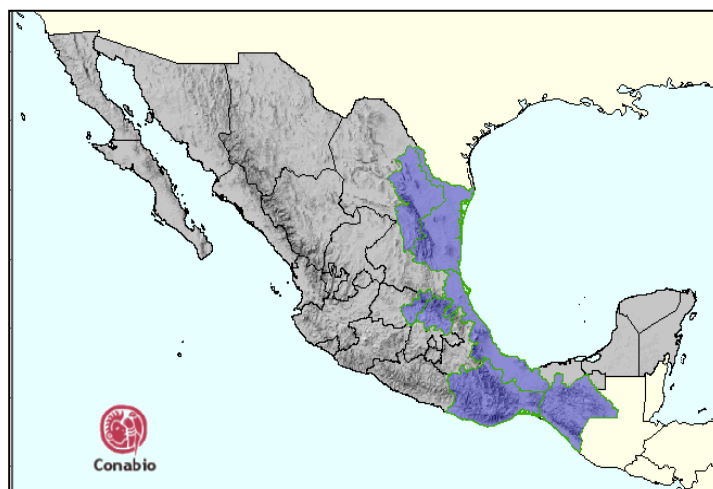
#### 2.4.3. Biología y hábitat.

Habita en bosques mesófilo de montaña, pino y oyamel, generalmente en el fondo de cañadas húmedas, en altitudes entre 1 000 y 3 000 msnm. (Zavala-Chávez, 2001).

#### 2.4.4. Distribución geográfica en México.

De los cuatro tejos nativos del hemisferio occidental, el menos conocido es el árbol del tejo mexicano (*T. globosa*), este árbol se distribuye de manera discontinua en México, por ejemplo: en el norte se localiza en los Estados de Tamaulipas y Nuevo León, en el centro en Hidalgo y Querétaro y en el sur en el Estado de Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Figura 15). Por sus características biológicas, este árbol es considerado como raro en las categorías oficiales de conservación de especies sujeta a protección especial, incluida en la Norma

Ecológica 059 (NOM-ECOL-059-2010 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo) (Diario Oficial, 2010), por lo que se requiere estudiarla para fines de protección, propagación, conservación y posible cultivo (Zavala-Chávez, 2002).



**Figura 15.** Distribución geográfica de *T. globosa* en México. (CONABIO, 2001).

#### **2.4.5. Aspectos fitoquímicos y actividad biológica de *T. globosa*.**

Se han realizado estudios de *T. globosa* donde se reporta la producción de taxol (Strobel et al. 1993). En un estudio reciente se reportó la presencia de taxol en corteza (0.0085%), hojas (0.0130 %) y tallo (0.0064%) de *T. globosa*, observándose una mayor acumulación de taxol en el follaje que en la corteza (Soto et al., 2000). Se comprobó también a partir de las fracciones orgánicas obtenidas de corteza, hojas y tallos jóvenes, la actividad polimerizadora mediante el método de Shelanski et al. (1973), la actividad estabilizadora de microtúbulos se determinó por el método turbidimétrico de Swindell et al. (1991) en el que utilizaron como estándar puro el taxol. En este estudio se demostró que la actividad relativa fue mayor empleando la corteza (1.09) y hojas (0.52), que empleando el tallo de *T. globosa* (0.31), como control utilizaron GTP (0.99) (Soto et al. 2000). Se evaluó también la actividad polimerizadora de tubulina sobre células en cultivo CHO (células de ovario de hámster chino) por medio de técnicas de inmunofluorescencia en las tres fracciones analizadas de corteza, hojas y tallos jóvenes (Cruz, 1996).



A partir de *T. globosa* se han reportado también otros metabolitos secundarios obtenidos como son:  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosteril- $\beta$ -D-glucopiranosido, ácido vanílico y un peracetil taxano identificado como 5 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 9 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 13 $\alpha$ -pentaacetoxi-4(20),11-taxadieno (7 $\beta$ -acetoxi-taxusina) (Guerrero et al. 2000). En el mismo año en que se reporta en México el estudio fitoquímico de *T. globosa*; en Holanda van Rozendaal et al. (2000), reportan la producción de taxol y taxanos relacionados en diferentes especies de *Taxus*, donde incluyen al tejo mexicano *T. globosa* como una de las especies de mayor contenido de taxol y de sus precursores (van Rozendaal et al. 2000) (Tabla 2).

La mayor proporción de taxol en el follaje de *T. globosa* plantea la posibilidad de cultivo celular a partir de hojas, pudiéndose seleccionar líneas celulares altamente productoras de este diterpeno.

**Tabla 2.** Contenido de taxol y taxanos relacionados en diferentes especies del género *Taxus*

ESPECIE	CONCENTRACIÓN (µg/g PS)						TOTAL
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	
<i>T. baccata</i>	41	198	22	14	3	762	1039
<i>T. baccata v.</i>	63	179	42	10	6	468	768
<i>T. brevifolia</i>	130	0	0	296	9132	41	9599
<i>T. canadensis</i>	285	253	289	224	77	2665	3793
<i>T. celebica</i>	26	81	0	0	46	70	223
<i>T. cuspidata</i>	105	113	40	15	6	120	399
<i>T. cuspidata cv</i>	136	198	93	18	1	116	562
<i>T. floridana</i>	516	515	0	0	0	1689	2720
<b><i>T. globosa</i></b>	<b>433</b>	<b>229</b>	<b>480</b>	<b>168</b>	<b>0</b>	<b>1395</b>	<b>2705</b>
<i>T. x hunnewelliana</i>	41	100	0	0	0	63	204
<i>T. x media cv</i>	211	205	131	36	6	230	819
<i>T. wallichiana</i>	272	420	0	0	0	1092	1784

(1) taxol, (2) 10-deacetiltaxol, (3) cefalomanina, (4) baccatina III, (5) brevifoliol, (6) 10-deacetilbaccatina III (Tomado de Van Rozendaal et al. 2000)

#### 2.4.6. Cultivo *in vitro* de *T. globosa*.

En México son escasos los reportes sobre el cultivo *in vitro* de *T. globosa*, en la Tabla 3 se mencionan los primeros reportes de la producción de taxanos *in vitro*.

**Tabla 3.** Obtención de diferentes metabolitos a partir de cultivos *in vitro* de *T. globosa*.

<b>Metabolito secundario</b>	<b>Máxima concentración (tiempo)</b>	<b>Tipo de cultivo</b>	<b>Tipo de medio</b>	<b>Autor</b>
Taxol	27 µg/g PS (40 días)	Callo	SH +ANA 2,4-D, BAP Estimulados (ccc)	Barrios et al. 2009
Baccatina III	6.45 mg/L (10 días)	Células en suspensión	Gamborg B5 + 2,4-D Estimulados (MeJ)	Barradas et al. 2010
Taxanos totales	0.044 µg (40 días)	Callo	Gamborg B5 + ANA (10.74µM)	Barrales et al. 2011

*Simbología: MeJ: jasmonato de metilo; ccc: cloruro de clorocolina.*

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las especies del género *Taxus* son conocidas por contener taxanos, un grupo de compuestos al que pertenece el compuesto anticancerígeno llamado taxol. En México se encuentra solo una especie del género *Taxus*, la cual se ha clasificado como *T. globosa* Schltidl (tejo mexicano), este árbol se distribuye con baja densidad, por tal motivo el gobierno mexicano la tiene clasificada como una especie protegida por la SEMARNAT. En México no existe un programa agrobiológico, ni biotecnológico para la multiplicación y conservación de la especie en su hábitat; sin embargo, diferentes grupos de investigadores nacionales y extranjeros están interesados actualmente en esta especie debido a su potencial metabólico, lo que puede poner en peligro a la especie si se emplean grandes cantidades de corteza y área foliar de ejemplares silvestres de manera clandestina. Dada la importancia de la especie, se inició el establecimiento de los cultivos *in vitro* de *T.globosa*, con la finalidad de desarrollar un sistema biotecnológico que permitiera obtener líneas celulares productoras de taxol y sus precursores, para estimular su producción y excreción al medio de cultivo mediante el uso de diferentes estrategias biotecnológicas.

Es por ello, que en el presente trabajo de investigación se pretende evaluar diferentes estrategias biotecnológicas como son: el tipo de cultivo, formulación del medio, cultivo tipo lote y cultivo en dos fases, el uso de estimuladores y la inmovilización celular, con la finalidad de incrementar la producción de taxol y taxanos relacionados y/o estimular su excreción, en los cultivos de células *in vitro* de *T. globosa*, lo que permitirá evitar la depredación de la especie en su hábitat, además de contar con una alternativa sustentable y viable para la obtención de tan importantes metabolitos anticancerígenos de origen diterpénico.

#### 3.1. ¿Preguntas de investigación?

¿El uso de diferentes estrategias biotecnológicas como son: el tipo de cultivo, formulación del medio, cultivo tipo lote y cultivo en dos fases, el uso de estimuladores y la inmovilización celular estimulara e incrementara el metabolismo *in vitro* de los taxanos marcadores de la especie?

¿La excreción de los taxanos al medio de cultivo se estimulara por efecto tanto de la estimulación como de la inmovilización celular en los cultivos *in vitro* de *T. globosa*?

#### **4. HIPÓTESIS**

El uso de diferentes estrategias biotecnológicas como son: el tipo de cultivo, formulación del medio, cultivo tipo lote y cultivo en dos fases, el uso de estimuladores y la inmovilización celular en los cultivos *in vitro* de *T. globosa*, permitirá el incremento de la producción de taxol y taxanos relacionados así como su excreción al medio de cultivo.

#### **5. OBJETIVOS GENERALES**

Optimizar la producción de taxol y taxanos relacionados en los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*, aplicando diferentes estrategias biotecnológicas.

Estimular la excreción de taxol y taxanos relacionados en los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*.

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Establecer y caracterizar los cultivos de callos y células en suspensión de *T. globosa*.
2. Determinar el tamaño de inóculo óptimo en los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*.
3. Evaluar el efecto del jasmonato de metilo sobre el crecimiento celular y producción de taxol y taxanos relacionados en los cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa*.
4. Evaluar el efecto del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y jasmonato de metilo (MeJ), sobre la producción de taxol y taxanos relacionados en los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de *T. globosa*.
5. Estudiar el efecto de la inmovilización celular sobre la producción de taxol y taxanos relacionados en los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de *T. globosa*.

6. Establecer las cinéticas de crecimiento celular y producción de taxanos para seleccionar la línea celular productora y excretora en los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **7.1. Establecimiento de los cultivos *in vitro* de *T. globosa*.**

#### **7.1.1. Inducción y establecimiento de los cultivos de callo.**

Se utilizaron explantes de hojas (acículas) y tallos jóvenes de ejemplares silvestres de *T. globosa*, colectados durante los meses de octubre y diciembre del 2010 en el Estado de Hidalgo (México). Los explantes fueron desinfectados superficialmente, a través de lavados con etanol al 70%, fungicidas e hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones. Las hojas se separaron de los tallos con la ayuda de un bisturí y los tallos se cortaron de los extremos para eliminar el material dañado por efecto del hipoclorito de sodio; los segmentos de tallo (longitud 0.8 a 1.0 cm) fueron cortados longitudinalmente a la mitad para favorecer la inducción de callo. Los explantes se sembraron en medio Gamborg (B5) (Gamborg et al. 1968) libre de hormonas complementado con sacarosa al 3% y solidificado con 0.3 % de fitagel (marca SIGMA); después de 20 días en cultivo, se verificó la ausencia de bacterias y hongos. Una vez obtenidos los explantes asépticos de hoja y tallo se cultivaron durante dos meses hasta obtener la desdiferenciación total en medio B5 añadido de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 2 mg/L), cinetina (CN, 0.5 mg/L), ácido giberélico (GA<sub>3</sub>, 0.25 mg/L), sacarosa (3%) y solidificado con 0.3 % de fitagel (TI) o en medio B5 añadido de Picloram (PIC, 2 mg/L), CN (0.1 mg/L), GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L), sacarosa (3%) y solidificado con 0.3% de fitagel (TII).

Los cultivos se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura a 25±2 °C y en oscuridad. Los callos desarrollados fueron subcultivados en medio B5 añadido de 2,4-D (2 mg/L), Benzilaminopurina (BAP) (0.1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) (TIII), cada 10 o 12 días hasta obtener suficiente biomasa de callos friables, para el desarrollo del cultivo celular (Cusidó et al. 2002).

### **7.1.2. Crecimiento celular y producción de taxanos en callos de *T. globosa*.**

Con el fin de determinar la cinética de crecimiento celular y producción de taxanos se evaluaron dos medios basales, el *Woody Plant Medium* (WPM) (McCown et al. 1981) y el medio B5. Se tomaron 500 mg de material de callo en peso fresco (PF) y se transfirieron a cajas Petri que contenían 20 mL de medio WPM con sacarosa (1%) y fructosa (1%) o medio B5 con sacarosa (3%), ambos medios añadidos de reguladores de crecimiento como son PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) y solidificados con 0.3% de fitagel.

Para determinar el crecimiento en peso fresco (PF), se tomaron 5 muestras de material de callo cultivados en cada uno de los medios de cultivo, cada semana durante un periodo de 6 semanas y se pesaron por separado. El peso seco (PS) se determinó a partir de los callos liofilizados.

Los parámetros de crecimiento se establecieron con base al peso seco determinando el índice de crecimiento (IC) y tiempo de duplicación (td) (Brunakova et al. 2004). A partir del material vegetal seco se realizó el análisis cromatográfico del contenido de taxanos.

### **7.2. Establecimiento del cultivo de células en suspensión de *T. globosa*.**

Los cultivos de células en suspensión de *T. globosa* se establecieron a partir de callos friables (10 g de PF), los cuales fueron sembrados en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de medio WPM añadido de PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L), GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) y como fuentes de carbono se utilizaron sacarosa (1%) y fructosa (1%). Los cultivos se mantuvieron en un agitador orbital a 110 rpm en condiciones de oscuridad a 25±2 °C durante 12 ó 15 días, hasta que obtener suficiente biomasa para las diferentes experimentaciones.

### **7.3. Determinación del tamaño de inóculo.**

Se realizaron cinéticas de crecimiento en cultivos tipo lote para determinar el tamaño de inóculo y optimizar el crecimiento de células en suspensión de *T. globosa*. Para ello se evaluaron los siguientes tamaños: 50, 100, y 150 g/L en peso fresco. Las células se cultivaron en medio WPM añadido de PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L), GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L), sacarosa



(1%) y fructosa (1%) durante 30 días. Los matraces se mantuvieron en agitación (110 rpm) en cuarto de cultivo a  $25\pm 2$  °C y en condiciones de oscuridad. Se tomaron muestras por triplicado cada tercer día.

Las variables que se determinaron fueron: peso fresco y seco, Índice de crecimiento, viabilidad celular, volumen final del medio, consumo de carbohidratos y concentración de taxanos en la biomasa y el medio de cultivo mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (Zhang et al. 2002).

#### **7.4. Efecto del jasmonato de metilo (MeJ) en la estimulación de la producción de taxol y taxanos relacionados, en los cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa*.**

Se evaluó el efecto de MeJ en dos medios basales WPM y B5, ambos añadidos de PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA3 (0.5 mg/L), sobre el crecimiento celular y la producción de taxanos. El MeJ (marca Aldrich) (100  $\mu$ M) (Exposito et al. 2010) se disolvió en etanol (Yukimune et al. 1996) y se añadió al medio de cultivo previa esterilización através de acrodisc estériles de 0.22  $\mu$ m marca PALL.

Los cultivos de células en suspensión de *T. globosa* previamente establecidos, se filtraron y se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 125 mL, que contenían 10 mL de los medios antes mencionados empleando un inóculo de 50 g PF/L. Los cultivos celulares se colocaron en un agitador orbital a 110 rpm, en condiciones controladas de temperatura  $25\pm 2$  °C y en oscuridad, durante 20 días. A lo largo de las cinéticas se tomaron tres muestras de cada tratamiento cada tercer día. Las biomásas secas a cada tiempo fueron utilizadas para determinar los parámetros de crecimiento y la producción de taxanos se analizó por CLAR, en la biomasa seca y el medio de cultivo en el que crecieron las células.

### 7.5. Evaluación del efecto del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y jasmonato de metilo (MeJ) sobre la producción de taxol y taxanos relacionados en cultivos tipo lote en dos fases, de células en suspensión de *T. globosa*.

Una vez determinado el tamaño de inóculo y evaluado el efecto del MeJ en cultivos tipo lote, se concluyó utilizar un medio de inducción de crecimiento y otro de inducción de la producción; para ello se planeó utilizar los cultivos tipo lote en dos fases para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (0, 0.02 y 0.2 M) sin y con MeJ (100  $\mu\text{M}$ ) en los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*. El experimento consistió en una primera fase, cultivar las células en medio de crecimiento WPM añadido de PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L),  $\text{GA}_3$  (0.5 mg/L), sacarosa (1%) y fructosa (1%) durante 20 días. Al término de este tiempo se eliminó el medio de crecimiento y se añadió el medio de producción B5 complementado de PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L),  $\text{GA}_3$  (0.5mg/L) y sacarosa (3%), condición bajo la cual se evaluaron 6 tratamientos durante 15 días más (Tabla 4). Los matraces se mantuvieron en agitación (110 rpm) en cuarto de cultivo en condiciones controladas a una temperatura de  $25\pm 2$  °C y en oscuridad, se tomaron muestras por triplicado cada tercer día hasta el final de las cinéticas. Las variables que se determinaron fueron: peso fresco y seco, volumen final del medio y concentración de taxanos en la biomasa y el medio de cultivo mediante CLAR (Zhang et al. 2002; Zhao y Sakai, 2003; Lee-Parsons y Erturk, 2005; Kim et al. 2006; Bonfill et al. 2006, 2007; Khosroushahi et al. 2006; Osuna et al. 2014).

**Tabla 4.** Tratamientos utilizados en la evaluación del efecto de  $\text{CaCl}_2$  y MeJ sobre la producción de taxanos, en los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de *T. globosa*.

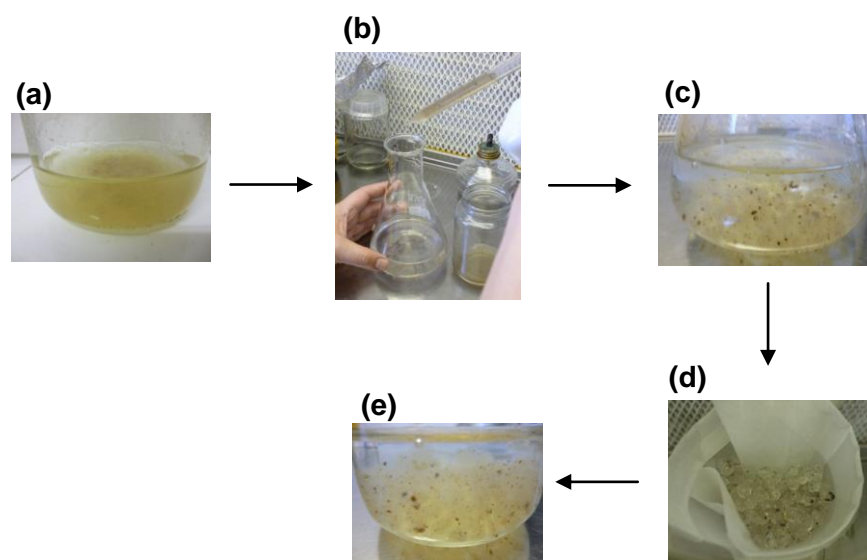
B5 Basal + tratamiento	$\text{CaCl}_2$ (M)	MeJ ( $\mu\text{M}$ )
I	0	0
II	0.02	0
III	0.2	0
VI	0	100
V	0.02	100
VI	0.2	100

Simbología: B5 Basal (B5 Gamborg modificado: sin cloruro de calcio)+PIC, CN y  $\text{GA}_3$ ;  $\text{CaCl}_2$ : Cloruro de calcio; MeJ: jasmonato de metilo.

## **7.6. Efecto de la inmovilización celular en los cultivos tipo lote en dos fases de células de *T. globosa*.**

En una experimentación previa, se evaluaron 5 concentraciones de alginato de sodio (2.5, 3, 3.5, 4 y 5%) para determinar la concentración adecuada para la formación de las perlas de alginato en medio WPM. Una vez determinada la concentración, se inicio el experimento de inmovilización celular utilizando la técnica descrita por Gillet et al. (2000) y modificada por Osuna et al. (2008). Se tomo  $1 \pm 0.5$  g de peso fresco de células en suspensión y se mezcló con 20 mL de solución estéril de alginato de sodio disuelto en medio WPM, posteriormente se dejó caer la mezcla gota a gota en 100 mL de solución estéril de cloruro de calcio al 0.2 M (concentración que en la etapa anterior estimuló el crecimiento celular), para formar las perlas biocatalizadoras por gelificación ionotrópica de alginato (Figura 16).

Las perlas de alginato con células atrapadas se endurecieron en la solución de cloruro de calcio por 30 min y posteriormente fueron lavadas con medio de cultivo estéril. Las perlas se filtraron y subcultivaron en las mismas condiciones que las células libres en el medio WPM añadido de PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L), sacarosa (1%) y fructosa (1%) durante 20 días. Al término de este tiempo se eliminó el medio de crecimiento y se añadió el medio de producción, evaluando dos tratamientos: (T1) B5 añadido de 2,4-D(2 mg/L), BAP (0.1 mg/L), GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) y sacarosa (3%) y B5 añadido de PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) y sacarosa (3%) (T2), sin y con MeJ, durante 15 días más. Los matraces se mantuvieron en agitación (110 rpm) en cuarto de cultivo en condiciones controladas de temperatura  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad, se tomaron muestras por triplicado cada tercer día.



**Figura 16.** Proceso de inmovilización de células de *T. globosa* en perlas de alginato. (a) Células en la solución de alginato de sodio en el medio de cultivo. (b) Adición de la solución de alginato conteniendo las células en la solución de  $\text{CaCl}_2$ . (c) Perlas (células encapsuladas) en la solución de  $\text{CaCl}_2$  en agitación. (d) Filtrado y lavado de las perlas. (e) Perlas subcultivadas en el medio WPM.

Las variables que se determinaron fueron: peso fresco y seco, volumen final del medio, cuantificación del consumo de carbohidratos y concentración de taxanos en la biomasa y el medio de cultivo mediante CLAR (Bentebibel et al. 2005; Bonfill et al. 2007; Osuna et al. 2008).

## 7.7. Metodología química y análisis cromatográfico.

### 7.7.1. Extracción de taxanos a partir de biomasa.

Para las extracciones, por cada 50 mg de peso seco de células se añadió 1-2 mL de hexano en tubos de vidrio. Después de 12 h a 25 °C se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm durante 20 min y los sobrenadantes se desecharon. Los sedimentos se extrajeron con 1 mL de la mezcla de  $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) en baño ultrasónico durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 12 000 rpm durante 20 min, se tomaron en este caso los sobrenadantes. Los extractos se concentraron a 25 °C al vacío y se fraccionaron por bipartición en 1 mL de diclorometano más 1 mL de agua destilada; después de agitar con

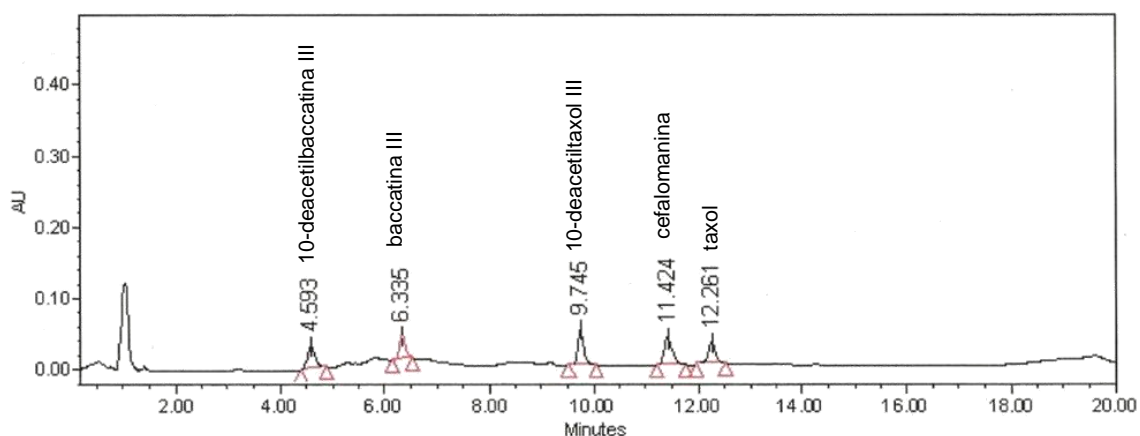
vórtex durante 10 seg se volvieron a centrifugar a 12 000 rpm durante 20 min', separadas las fracciones orgánicas se llevaron a sequedad para redissolverlas finalmente en 500 µL de MeOH grado HPLC para su análisis por CLAR.

#### **7.7.2. Extracción de taxanos a partir del medio de cultivo.**

Para la extracción de los taxanos a partir del medio de cultivo en el que se cultivaron las suspensiones celulares, se les añadió el 25% de su volumen de diclorometano y se agitaron durante 2 min en vórtex, a continuación, se llevaron a baño ultrasónico durante 1 h. Los extractos orgánicos se concentraron empleando un rotavapor en condiciones de vacío y finalmente los residuos se redisolieron en 500 µL de MeOH grado HPLC, quedando así dispuestas las muestras para su análisis por CLAR.

#### **7.8. Identificación y cuantificación de taxanos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).**

La producción de taxol y otros taxanos se determinó siguiendo la metodología descrita por Richeimer et al. (1992). Se utilizó un equipo Waters 2695 y detector de arreglo de diodos 2996. La fase móvil utilizada fue CH<sub>3</sub>CN: H<sub>2</sub>O (25:75) en un sistema de gradientes. Las corridas se realizaron durante 20 min y el flujo del gradiente fue de 1 mL/min. Las muestras se analizaron en una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 225 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL en una columna LiChrospher RP18 (5µm). El taxol y otros taxanos fueron identificados por comparación del tiempo de (tr) y espectro de absorción; en tanto que la cuantificación por el método de estándar externo (Figura 17), utilizando estándares de marca Hauser Chemicals (USA) y SIGMA (EE.UU) disueltos en MeOH grado HPLC.



**Figura 17.** Cromatograma de los 5 taxanos cuantificados por CLAR.

### 7.9. Estimación del consumo de carbohidratos mediante CLAR.

El consumo de carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructuosa) se determinó modificando el método descrito por De Vries y Egberg (1979), a partir del medio de cultivo en el que crecieron las células. Se realizó por triplicado del análisis del medio de cultivo previamente filtrado, empleando un volumen de inyección de 80  $\mu$ L. Las curvas de calibración se realizaron utilizando estándares puros (marca SIGMA) disueltos en H<sub>2</sub>O grado HPLC. La cuantificación se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución, en un equipo Waters 2695, con un detector de índice de refracción Waters 2414 y una columna de amino LiChrospher® 100 NH<sub>2</sub> (10  $\mu$ m). Como fase móvil se utilizó un sistema isocrático de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (80:20), con un flujo de inyección de 1.5 mL/min.

### 7.10. Variables de respuesta que se determinaron.

#### 7.10.1 Parámetros de Crecimiento.

Los parámetros de crecimiento se calcularon con base al peso seco para obtener el índice de crecimiento, velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación, de la siguiente manera:

$$\text{Índice de Crecimiento:} = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso inicial}}$$

**Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )**, calculada mediante el modelo matemático de Monod cuya ecuación es:

$$\mu x = \frac{dx}{dt}$$

donde  $dx$  = incremento de la biomasa celular en PS

$dt$  = incremento por unidad de tiempo

$x$  = biomasa celular al tiempo 0

**Tiempo de duplicación (td)**: una vez calculada la  $\mu$ , el tiempo de duplicación celular se calculó con base a la siguiente ecuación:

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

#### 7.10.2. Parámetros de Producción.

Una vez realizados los análisis cromatográficos de cada una de las muestras se determinaron los siguientes parámetros de producción para taxanos.

Concentración = (mg/L)

Productividad = (g/L día<sup>-1</sup>)

#### 7.11. Viabilidad celular.

La viabilidad de las células en todas las condiciones de cultivo se estudió utilizando el método descrito por Duncan y Widholm (1990). Para ello, se tomó alícuota de la suspensión que se colocó en el portaobjetos y se mezcló con una gota de una solución marcadora de diacetato de fluoresceína (DAF). El colorante vital DAF es hidrolizado por esterasas membranales presentes en células vivas produciendo de este modo la fluorescencia, molécula que al excitarse a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 490 nm (luz azul), emite a un  $\lambda = 520$  nm, observándose una fluorescencia verde en un microscopio de fluorescencia. Los resultados se expresan como el porcentaje de células vivas de las células totales.

### **7.12. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó en el programa de The SAS system V.8, utilizando el diseño de bloques completamente al azar, aplicando anova y tukey.

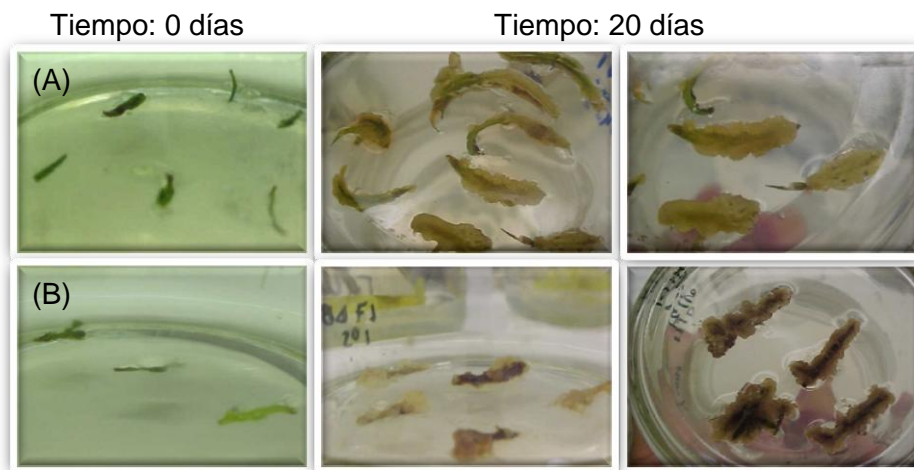


## 8. RESULTADOS

### 8.1. Inducción y establecimiento de los cultivos de callos.

Mediante el proceso de esterilización empleado en esta investigación, se obtuvo el 97% de los explantes de hojas y 89% de los explantes tallo sin contaminación después de 15 días.

A partir de los explantes asépticos, se indujo de manera diferente la formación de callo por efecto de los tratamientos TI (2,4-D) y TII (PIC) después de 20 días. Con el TI el porcentaje de inducción de callo en hojas y tallo fue del 100% y 80%, respectivamente, mientras que en TII no fue mayor a 40%. Los callos obtenidos a partir de hojas fueron de color claro y de consistencia friable a diferencia de los callos inducidos a partir de tallos (Figura 18). El porcentaje de inducción de callo en el tejo mexicano fue similar a lo reportado por otros autores en el tejo europeo, por ejemplo, el 96% de inducción de callo en tallos jóvenes *T. baccata* después de 20 días en medio B5 (Correa et al. 2006), el 85% a partir de embriones y el 100% a partir de brotes en medio Murashige & Skoog (MS) (Mihaljevic et al. 2002).



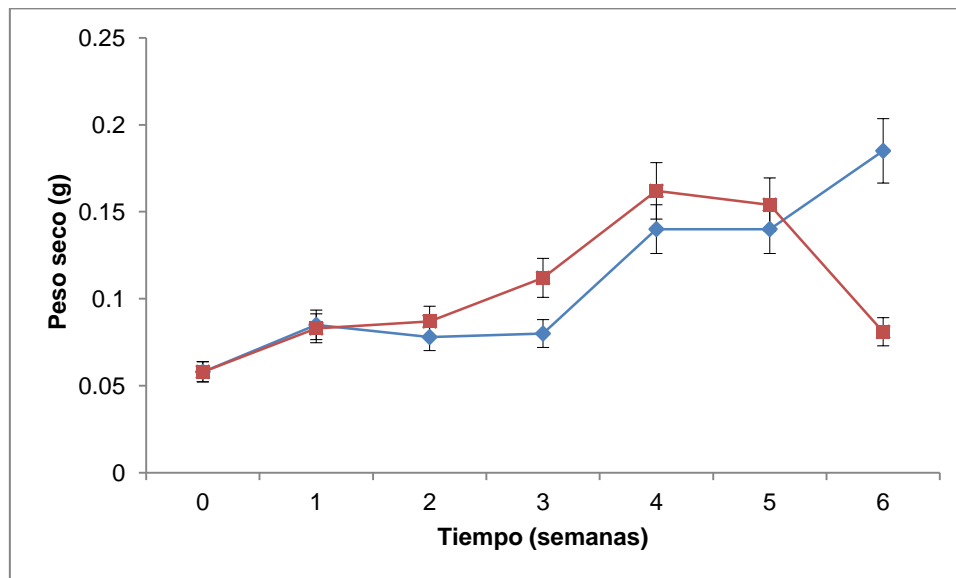
**Figura 18.** Diferentes etapas de formación de callos de hojas (A) y tallos (B) de *T. globosa* en medio B5 (TI).

El efecto del tratamiento TIII (medio B5 añadido de 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub>) fue determinante para incrementar la biomasa (100 %) y la friabilidad en los cultivos de callo de *T. globosa*, es posible que este efecto se deba a la auxina 2,4-D en combinación con BAP, aspecto que se ha observado en otras especies vegetales, por ejemplo: en callos de *Panax ginseng* en el que 2 mg/L de 2,4-D promovió el crecimiento celular y la friabilidad e inhibió la organogénesis (Bonfill et al. 2002). La auxina sintética 2,4-D es conocida por ser un promotor general de formación de biomasa, ya que induce la dediferenciación celular que conduce al desarrollo de callo (Brown y Charlwood 1990). Por otro lado, la citocina BAP ha mostrado ser muy eficaz para estimular el crecimiento de cultivos celulares de varias especies de *Taxus*: *T. baccata* (Moon et al. 1998; Palazón et al. 2003), *T. cuspidata* y *T. canadensis* (Vongpaseuth y Roberts 2007), *T. cuspidata* (Nims et al. 2006), y *T. brevifolia* (Kim et al. 2000; Khosroushahi et al. 2011).

## **8.2. Crecimiento celular y producción de taxanos en callos de *T. globosa*.**

Una vez obtenidos callos friables en la etapa anterior, se determinó el crecimiento celular y la producción de taxanos en dos medios basales: WPM y B5 ambos medios complementados con los reguladores de crecimiento PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L). La eficacia de la PIC en la promoción del crecimiento de las células en especies de *Taxus* está ampliamente reportada (Furmanowa et al. 1997; Ketchum et al. 1995). Además, el grupo del Dr. Palazón, demostró después de realizar 48 ensayos en diferentes medios de cultivos, que la mejor producción de taxol en cultivos de células *T. baccata* se logra mediante la combinación de reguladores de crecimiento utilizados en este trabajo (Palazón et al. 2003).

Como resultado del experimento, observamos que los callos *T. globosa* cultivados en WPM presentan el mayor crecimiento a partir de la cuarta y hasta la sexta semana de cultivo, con un índice de crecimiento (IC) de 0.70 y un tiempo de duplicación promedio (td) de 13.2 días. Por otro lado, los callos que se cultivaron en medio B5 incrementaron la biomasa a partir de la cuarta semana de cultivo. Después de este tiempo, las células entraron en fase estacionaria, que duró una semana más, disminuyendo posteriormente el crecimiento celular al final de la cinética. En ambos medios de cultivo evaluados, la fase de adaptación duró al menos dos semanas. En medio B5, el IC fue de 0.44 y el td de 13.8 días (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Efecto del medio cultivo WPM y B5 añadidos de PIC, CN y GA<sub>3</sub> sobre el crecimiento celular en los cultivos de callo de *T. globosa*. (n=3) X±DE; Tratamientos: ♦ WPM; ■ B5.

El promedio del td obtenido en los cultivos de callos esta dentro del rango reportado para otras especies de *Taxus*: *T. media* (14 días) (Hirasuna et al. 1996), *T. media* y *T. baccata* (13 días) (Wickremesinhe y Arteca 1993).

Los callos cultivados en ambos medios tienen la capacidad de producir los taxanos a lo largo de las cinéticas. La producción y acumulación de taxol en callos cultivados en WPM, se produjo principalmente en la primera semana (16 µg/g PS) y en la sexta semana (24 µg/g PS) de cultivo. Por otro lado, la producción de 10-deacetylaxol se mantuvo constante a lo largo de la cinética, obteniendo producciones similares al taxol (23.87 µg/g PS). Con respecto a los callos cultivados en B5 la producción de taxol (50 µg/g PS) se incrementó al doble y en menor tiempo que en los cultivos antes mencionados (Tabla 5).

**Tabla 5.** Contenido de taxanos en callos de *T. globosa* cultivados en B5 o WPM, suplementados con PIC, CN y GA<sub>3</sub>.

<b>Medio</b>	<b>Taxol µg/g PS</b>	<b>B III µg/g PS</b>	<b>10-DB III µg/g PS</b>	<b>10-DT µg/g PS</b>	<b>Cef µg/g PS</b>	<b>Total µg/g PS</b>
<b>B5</b>	50	38.06	8.73	80.82	ND	177.61
<b>WPM</b>	24	22.03	16.02	23.87	ND	85.92

*Simbología: B III: baccatina III; 10-DB III: 10-deacetilbaccatina III; 10-DT: 10-deacetiltaxol; Cef: cefalomanina; ND: no se detecto.*

La producción de taxol y taxanos relacionados obtenidos en cultivos de callos de *T. globosa* fue el doble (50 µg/g PS) que lo reportado por Barrios et al. (2009) (27 µg/g PS), y significativamente más alto que lo reportado por Barrales et al. (2011) (0.0133 µg).

### **8.3. Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *T. globosa*.**

Los cultivos de células en suspensión se establecieron a partir de callos friables derivados de hojas de *T. globosa*, los cuales fueron subcultivados en medio WPM añadido de PIC, CN y GA<sub>3</sub>, subcultivando cada 15 días, hasta que se obtuvo suficiente biomasa para las diferentes cinéticas.

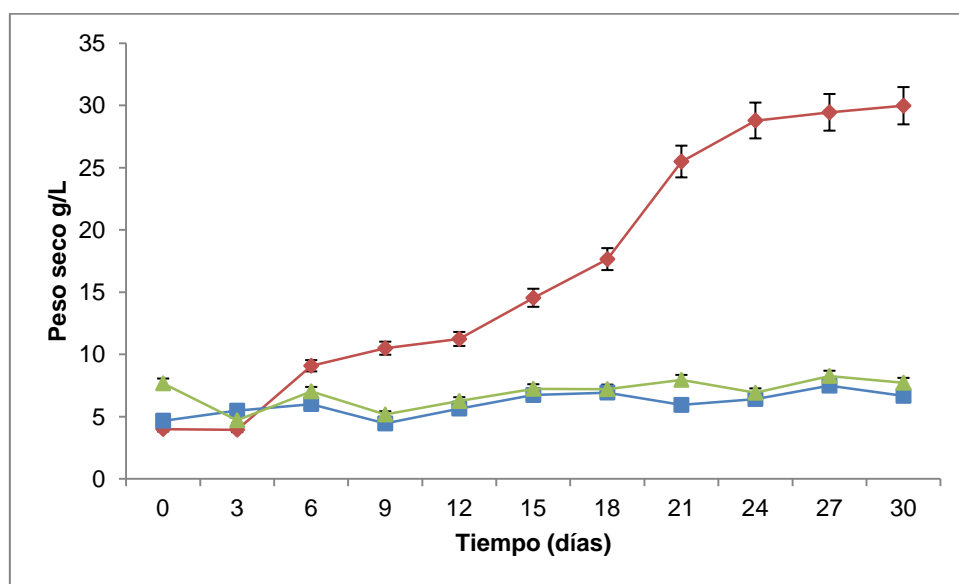
### **8.4. Determinación del tamaño de inóculo.**

Una vez establecidos los cultivos líquidos de *T. globosa*, se determinó el mejor tamaño de inóculo para optimizar el crecimiento celular de los cultivos líquidos de *T. globosa*, evaluando tres tamaños de inóculo. A lo largo de la cinéticas se pudieron observar cambios de coloración en los medios, desde un color amarillo claro a rojizo intenso, observándose también cambios significativos en la biomasa, en donde a mayor tamaño de inóculo los cultivos tienden a formar agregados celulares de coloración café rojizo, por la acumulación de fenoles, que se pueden observar a simple vista.

En la Gráfica 2 se observa el efecto de los diferentes tamaños de inóculo sobre el crecimiento celular en peso seco. En los cultivos en donde se utilizaron los tamaños de

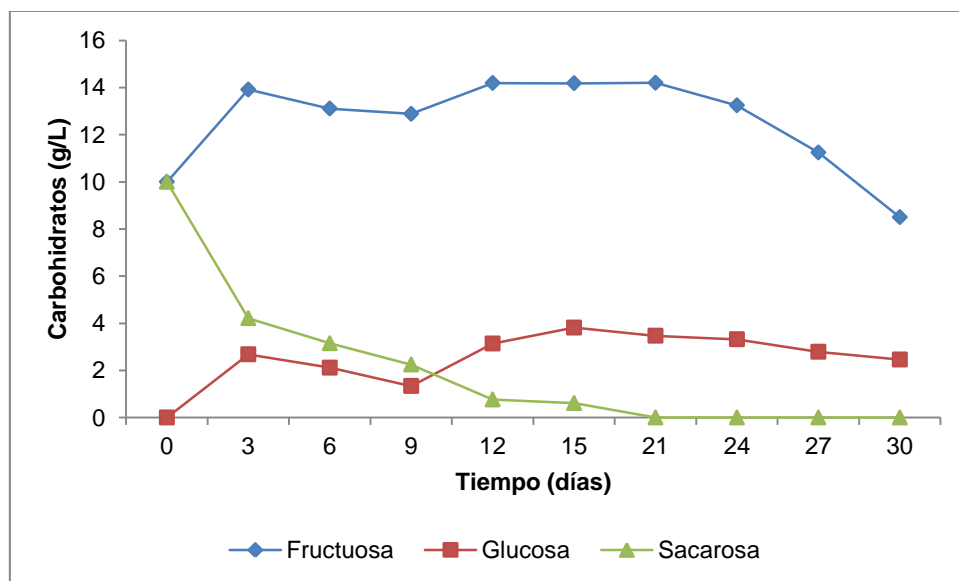
inóculo más altos (100 y 150 g PF/L), el crecimiento celular se inhibió en un 81.5% a los 21 días de las cinéticas con respecto al tamaño de inóculo de 50 g PF/L.

Con el tamaño de inóculo de 50 g PF/L se observaron tres fases de crecimiento características de los cultivos de células vegetales, como son la fase de adaptación, la fase de crecimiento logarítmico o lineal y estacionaria, por lo que se determinó que este inóculo es el adecuado para establecer los cultivos de celulares de *T. globosa*, los cuales presentaron un IC de 0.65 y un td de 3.9 días. Este tamaño de inóculo es 50% menor a lo reportado para otras especies de *Taxus* (100 g PF/L), por ejemplo *T. chinensis* (Wang et al. 2001), *T. media* (Cusido et al. 2002; Bonfill et al. 2003) y *T. baccata* (Expósito et al. 2009a; Onrubia et al. 2011) y cuatro veces menor que lo reportado para *T. yunnanensis* (200 g PF/L) (Zhang et al. 2002).



**Gráfica 2.** Efecto del tamaño de inóculo sobre el crecimiento celular de los cultivos tipo lote de *T. globosa*. (n=3)  $X \pm DE$ . Tratamientos: ◆ 50 g PF/L; ■ 100 g PF/L; ▲ 150 g PF/L.

En la Gráfica 3 se presenta el consumo de los carbohidratos en los cultivos de células en suspensión con tamaño de inóculo de 50 g PF/L, en la que se observa que a partir del tiempo 21 días, la sacarosa se consume en su totalidad y la fructosa empieza a consumirse, en esta etapa los cultivos entran en fase estacionaria, la glucosa no se consume hasta el final de la cinética, lo que nos indica que para los cultivos celulares no es un carbohidrato necesario para estimular el crecimiento celular.



**Gráfica 3.** Consumo de los carbohidratos en los cultivos tipo lote de *T. globosa* (inóculo de 50 g PF/L). n=3, WPM + PIC, CN, GA<sub>3</sub>

Ahora bien, con respecto a la producción de taxanos los cultivos de células de *T. globosa* independientemente de tamaño de inóculo acumularon los diferentes taxanos. Por ejemplo en los cultivos celulares con un tamaño de inóculo de 50 g PF/L, las productividades de los taxanos fueron las más altas (excepto para 10-deacetilbaccatina III y 10-deacetiltaxol) que en los otros tamaños de inóculo estudiados y al contrario de los cultivos de callo, se logró estimular la producción de los 5 taxanos marcadores del género. En la Tabla 6 se presenta la producción de taxanos total (intra y extra celular) obtenida por efecto de los diferentes tamaños de inóculo en los cultivos de células de *T. globosa*.

**Tabla 6.** Efecto del tamaño de inóculo (PF) en la producción de taxanos en los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*.

Inóculo g PF/L	Tiempo (días)	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Productividad ( $\mu\text{g/L día}^{-1}$ )	Excreción (%)
<b>Taxol</b>				
50	12	60.389 $\pm$ 0.011*	5.032	0
100	15	56.079 $\pm$ 0.458	3.739	0
150	24	24.959 $\pm$ 5.954	1.040	0
<b>Baccatina III</b>				
50	6	136.217 $\pm$ 58.227*	22.703	98
100	27	159.777 $\pm$ 8.411	5.918	0
150	21	57.171 $\pm$ 4.569	2.722	0
<b>10-deacetilbaccatina III</b>				
50	6	524.391 $\pm$ 95.488	87.398	3
100	6	467.808 $\pm$ 39.410	77.968	0
150	6	655.887 $\pm$ 9.100*	109.315	0
<b>10-deacetiltaxol</b>				
50	9	155.301 $\pm$ 165.55	17.256	7
100	9	945.709 $\pm$ 15.221	105.079	0
150	18	1126.340 $\pm$ 11.442*	62.574	0
<b>Cefalomanina</b>				
50	6	23.836 $\pm$ 1.838*	3.973	0
100	-	ND	-	-
150	-	ND	-	-

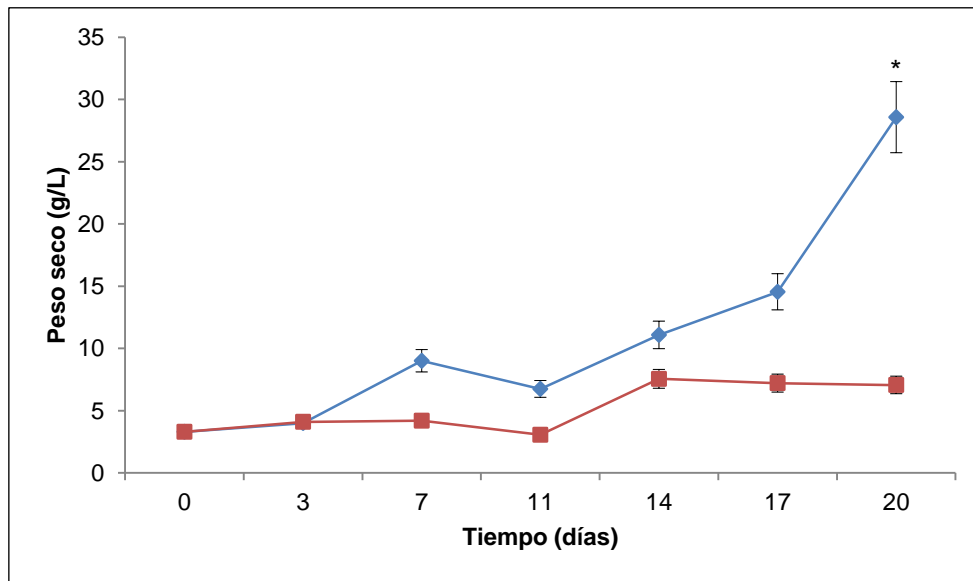
(n=3) X $\pm$ DE; \*Tukey. Simbología: ND: no se detecto.

### **8.5. Efecto del jasmonato de metilo (MeJ) en la estimulación de la producción de taxol y taxanos relacionados, en cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa*.**

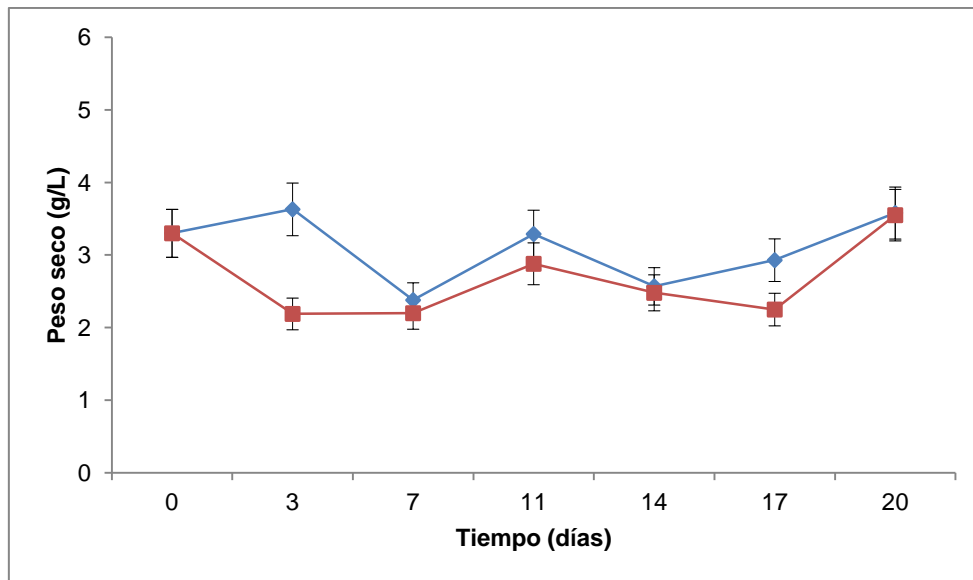
En esta etapa se utilizaron los cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa*, cultivados en dos medios WPM y B5, con y sin MeJ (100  $\mu$ M). Las células cultivadas en medio WPM y B5 sin estimular se utilizaron como cultivos control, estos cultivos presentaron una pigmentación color café-rojizo en el medio de cultivo, durante todo el experimento, mientras que los cultivos estimulados presentaron una coloración amarillo pálido en el medio de cultivo. La biomasa correspondiente a los cultivos WPM presentó una pigmentación de color café a lo largo de las cinéticas en todas las condiciones ensayadas, en contraste con las células cultivadas en B5, que no se oscurecieron tanto en los cultivos control como en los estimulados. Este cambio en el color de los cultivos, también se ha reportado en otras especies de *Taxus* (Malik et al. 2011), debido principalmente a la acumulación intracelular de compuestos fenólicos, que es provocado por la exposición de los cultivos a estrés nutricional. En este caso, los cultivos en suspensión de células cultivadas en WPM, producen mayor cantidad de compuestos fenólicos que se excretaron al medio de cultivo.

Las cinéticas de crecimiento de las células de *T. globosa* cultivadas en medio WPM y B5 se muestran en las Gráficas 4 y 5. Los cultivos de células en medio WPM sin estimular presentaron una fase de adaptación de 3 días y continuaron creciendo hasta el final de la cinética, mientras que en los cultivos estimulados con MeJ se inhibió el crecimiento celular. El td en los cultivos control fue 2.32 días y el IC fue 6.14, mientras que en los cultivos estimulados con MeJ presentaron un td de 3.06 días y el IC 0.77 (Gráfica 4). Los cultivos que crecieron en medio B5 no presentaron diferencias significativas entre los cultivos control y estimulados (Gráfica 5).



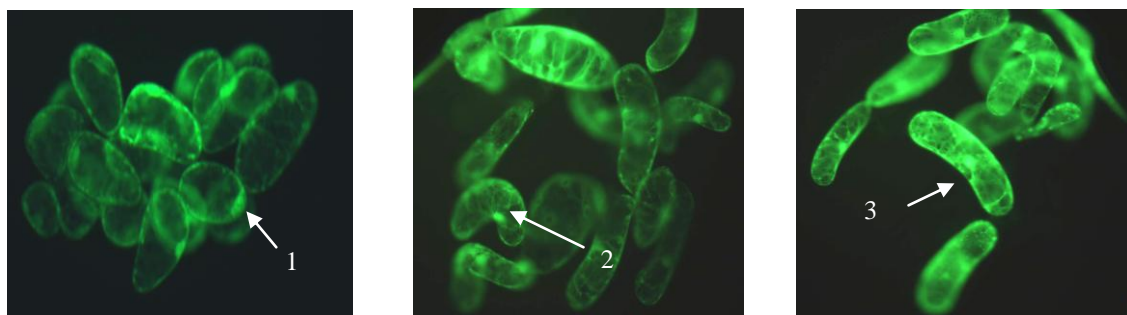


**Gráfica 4.** Efecto del medio de cultivo WPM + PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) y la estimulación con MeJ (100 μM), sobre el crecimiento celular en los cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa*. (n=3) X±DE; p<0.0001\*; Tratamientos: ♦ WPM; ■ WPM+MeJ.



**Gráfica 5.** Efecto del medio de cultivo B5 + PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) y la estimulación con MeJ (100 μM) sobre el crecimiento celular en los cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa*. (n=3) X±DE; p<0.0001\*; Tratamientos: ♦ B5; ■ B5+MeJ.

Las células de los cultivos control presentaron tres tipos de morfología: 1) esférica, 2) en forma de riñón y 3) alargada (Figura 19). Los cultivos estimulados también presentaron estas tres morfologías, aunque la mayoría de las células eran largas y delgadas, y con una pigmentación de color rojizo. Esta estructura celular puede indicar que el MeJ induce un estado avanzado de desarrollo y/o diferenciación en las células. Inicialmente, la viabilidad celular de los cultivos fue del 90%, disminuyendo a 50 y 45% para el control y los cultivos estimulados, respectivamente.



**Figura 19.** Diferentes morfologías celulares observadas en las células en suspensión de *T. globosa*. 1. Esférica, 2. En forma de riñón, 3. Alargada.

La Tabla 7 muestra los parámetros de producción para cada uno de los taxanos, en los cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa*, cultivadas en medio WPM y B5, con o sin MeJ. La producción de taxol se estimuló a lo largo de las cinéticas por efecto de los dos medios de cultivo (WPM y B5), tanto en los cultivos control como en los estimulados. Como podemos observar la producción de los taxanos en los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*, se incrementó principalmente por efecto del medio WPM añadido de MeJ. Con este medio se obtuvo una concentración total del taxol de 197.999  $\mu\text{g/L}$  con una productividad de 14.143  $\mu\text{g/L dia}^{-1}$ , a los 14 días de la cinética. Además de estimular los precursores del taxol como son: la 10-deacetilbaccatina III (633.724  $\mu\text{g/L dia}^{-1}$ ) y baccatina III (160.622  $\mu\text{g/L dia}^{-1}$ ) junto con el 10-deacetylaxol (229.611  $\mu\text{g/L dia}^{-1}$ ), este último, fue excretada en su totalidad al medio de cultivo. El efecto de MeJ *in vitro* se ha reportado ampliamente para otras especies de *Taxus* (Zhang et al. 2002; Wang et al. 2004; Bonfill et al. 2006), en donde ha estimulado considerablemente la producción de taxanos así como su excreción.

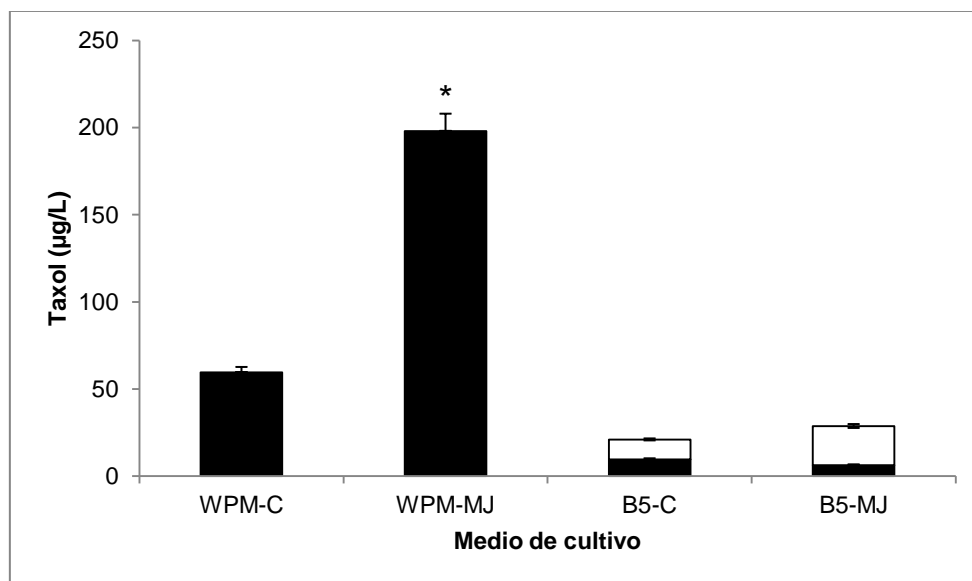
Con respecto a la cefalomanina, uno de los taxanos con importante actividad citotóxica, su producción se obtuvo principalmente de manera intracelular por efecto del medio B5 sin estimular (91.428 µg/L), con una productividad de 30.476 µg/L día<sup>-1</sup>.

**Tabla 7.** Parámetros de producción de taxanos totales (intra y extra celular), en los cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa* en medios WPM y B5 sin y con MeJ (100 µM).

Tipo de medio	Tiempo (días)	Concentración (µg/L)	Productividad (µg/L día <sup>-1</sup> )	Excreción (%)
<b>taxol</b>				
WPM-C	14	59.577±0.011	4.256	0
WPM-MeJ*	14	197.999±0.008	14.143	0
B5-C	17	20.990±2.580	1.235	54
B5-MeJ	20	28.683±1.211	1.434	77.8
<b>baccatina III</b>				
WPM-C	20	142.638±12.332	7.132	37.2
WPM-MeJ*	20	160.622±14.499	8.031	100
B5-C	3	36.256±3.075	12.085	75.5
B5-MeJ	17	40.898±2.240	2.406	85.5
<b>10-deacetilbaccatina III</b>				
WPM-C	7	520.077±94.693	74.297	15.5
WPM-MeJ*	14	633.724±10.412	45.266	56.5
B5-C	7	13.195±1.765	1.885	87.9
B5-MeJ	17	33.516±2.582	1.972	88.7
<b>10-deacetiltaxol</b>				
WPM-C	7	126.182±22.948	18.026	42.1
WPM-MeJ*	14	229.611±120.175	16.401	100
B5-C	7	9.365±1.775	3.935	58.1
B5-MeJ	20	35.882±4.808	1.794	69.7
<b>cefalomanina</b>				
WPM-C	7	23.634±1.822	3.376	0
WPM-MeJ	14	23.586±10.906	1.685	0
B5-C*	3	91.428±21.245	30.476	8.3
B5-MeJ	7	28.871±2.436	4.124	42.9

Simbología: WPM-C: WPM control; WPM-MeJ: WPM estimulado con MeJ (100 µM); B5-C: B5 control; B5-MeJ: B5 estimulado con MeJ (100 µM); (n±3) X±DE; \*Tukey.

Con estos resultados, podemos decir, que las mejores condiciones de cultivo para la producción intracelular de taxol se obtuvo en medio WPM añadido de MeJ, donde se estimuló la producción 9 veces con respecto a las células cultivadas en medio B5 con y sin MeJ, cuya productividad fue de  $14.143 \mu\text{g/L día}^{-1}$ . Por el contrario, las células cultivadas en medio B5, la productividad del taxol fue 10 veces menor ( $1.434 \mu\text{g/L día}^{-1}$ ) pero se estimuló su excreción de un 54 a 77.8 % (Gráfica 6).



**Gráfica 6.** Efecto del medio de cultivo WPM y B5 con y sin MeJ en la producción de taxol en células en suspensión de *T. globosa*. ( $n=3$ )  $X \pm DE$ ;  $p < 0.0001^*$ ; Tratamientos: WPM-C (WPM control); WPM-MeJ (WPM estimulado con MeJ  $100 \mu\text{M}$ ); B5-C (B5 control); B5-MeJ (B5 estimulado con MeJ  $100 \mu\text{M}$ ); ■ Intracelular; □ Extracelular.

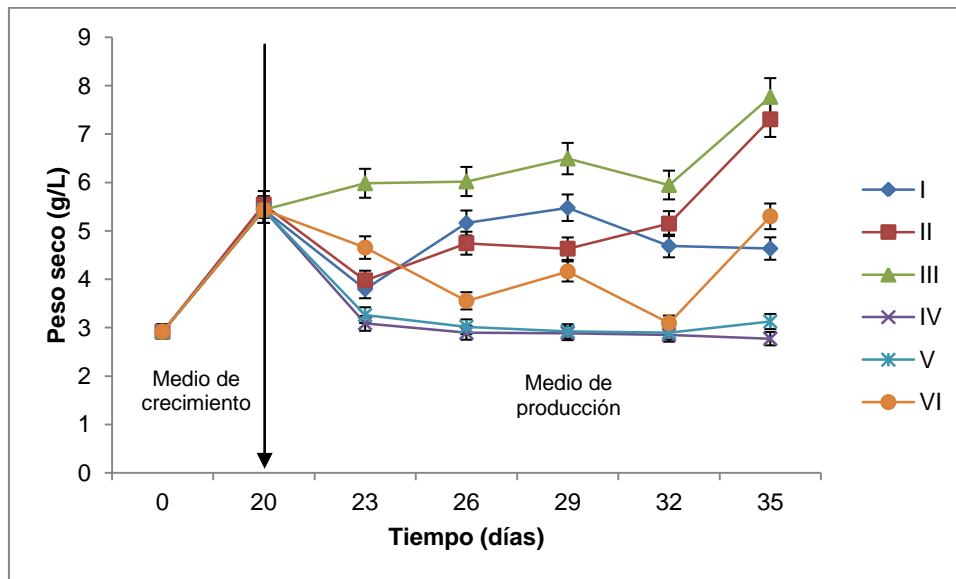
Los resultados hasta aquí obtenidos fueron publicados en la revista *Acta Physiologiae Plantarum* bajo el título de *Effect of the culture medium and biotic stimulation on taxane production in Taxus globosa Schldtl in vitro cultures* (2013; 35:3447-3455) (Ver ANEXO).

## 8.6. Efecto del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y jasmonato de metilo (MeJ) sobre la producción de taxol y taxanos relacionados en cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de *T. globosa*.

Con base a los resultados obtenidos en la evaluación de los medios WPM y B5, donde observamos que WPM estimula el crecimiento celular y el medio B5 la excreción de los taxanos al medio de cultivo, se decidió evaluar la estrategia de cultivos tipo lote en dos fases, además de evaluar el efecto de 3 concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (0, 0.02, 0.2 M) sin y con MeJ (100 $\mu\text{M}$ ). Los cultivos fueron subcultivados en una primera fase en un medio de crecimiento WPM añadido de PIC, CN y  $\text{GA}_3$  durante 20 días, al término de este tiempo se eliminó el medio de crecimiento y se añadió el medio de producción B5 añadido de PIC, CN y  $\text{GA}_3$ , donde se evaluaron 6 tratamientos durante 15 días más.

En la Gráfica 7 se presenta el efecto del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y jasmonato de metilo (MeJ) sobre el crecimiento celular en peso seco, en los cultivos tipo lote en dos fases de *T. globosa*. Se observa en la segunda fase o de producción el MeJ inhibe el crecimiento celular, esto ha sido reportado en otras especies de *Taxus*, por ejemplo *T. media* (Cusidó et al. 2002) y *T. baccata* (Onrubia et al 2011). Por otro lado el incremento de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo estimuló el crecimiento celular aún en presencia de MeJ, estos resultados difieren a lo reportado en otros cultivos vegetales tales como *Silene vulgaris* (Günter y Ovodov, 2005), *Plumbago rosea* (Komaraiah et al. 2002) y *Galphimia glauca* (Osuna et al. 2014), donde se reporta la inhibición del crecimiento celular por efecto del calcio en combinación con MeJ.

Con respecto a la producción de taxanos, la concentración normal del  $\text{CaCl}_2$  en medio B5 (Tratamiento II) y por efecto de la estrategia del cultivo en dos fases, se estimuló la producción de taxol 5 veces (338.944  $\mu\text{g/L}$ ) (15 días), con respecto a la producción de la línea celular de la que se partió (59.6  $\mu\text{g/L}$ ), con una productividad de 22.596  $\mu\text{g/L día}^{-1}$  (Tabla 8). Por otro lado, cuando se estimularon los cultivos con MeJ (Tratamiento VI) la concentración de taxol disminuyó (207.095  $\mu\text{g/L}$ ) al tiempo 6 de la segunda fase, sin embargo la productividad se incremento a 34.516  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ; por lo que podemos concluir que el MeJ estimula la biosíntesis del taxol.



**Grafica 7.** Efecto del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y jasmonato de metilo (MeJ) sobre el crecimiento celular de los cultivos tipo lote en dos fases de *T. globosa*. ( $n=3$ )  $\bar{X} \pm \text{DE}$ . TRATAMIENTOS: I (s/ $\text{CaCl}_2$ ); II ( $\text{CaCl}_2$  0.02 M); III ( $\text{CaCl}_2$  0.2 M); IV (s/ $\text{CaCl}_2$  + MeJ 100  $\mu\text{M}$ ); V ( $\text{CaCl}_2$  0.02 M + MeJ 100  $\mu\text{M}$ ); VI ( $\text{CaCl}_2$  0.2 M + MeJ 100  $\mu\text{M}$ ); ↓ Cambio de medio

En cuanto a la producción de los otros taxanos, se logró incrementar la producción de cefalomanina de 91.428  $\mu\text{g/L}$  (B5 en cultivo tipo lote) a 455.986  $\mu\text{g/L}$ , por efecto del cultivo tipo lote en dos fases y la estimulación con MeJ [tratamiento IV (s/ $\text{CaCl}_2$  + MeJ 100  $\mu\text{M}$ )], sin embargo la producción de 10-deacetilbaccatina III y baccatina III no se incrementó. Por otro lado, con la estrategia de cultivo en dos fases y el efecto  $\text{Ca}^{2+}$  y MeJ solo se logró la excreción al medio de cultivo de cefalomanina y no se estimuló la producción de 10-deacetiltaxol.

**Tabla 8.** Efecto de la estimulación con CaCl<sub>2</sub> y MeJ sobre la producción de taxanos totales (intra y extra celular), en los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de *T. globosa* (segunda fase o de producción).

Tratamiento	Tiempo (días)	Concentración (µg/L)	Productividad (µg/L día <sup>-1</sup> )	Excreción (%)
<b>taxol</b>				
I	9	127.541±3.586	14.171	0
II	15	338.944±6.301*	22.596	0
III	6	97.793±0.417	16.299	0
IV	6	178.816±3.191	29.803	0
V	6	207.095±1.456	34.516	0
VI	15	274.638±2.450	18.309	0
<b>baccatina III</b>				
I	3	14.017±1.764	4.672	0
II	3	78.861±4.006*	26.287	0
<b>10-deacetilbaccatina III</b>				
I	3	30.212±5.735	10.071	0
II	15	72.066±0.572*	4.804	0
III	15	36.356±0.491	2.424	0
IV	9	13.363±1.002	1.485	0
VI	15	26.140±0.384	1.743	0
<b>cefalomanina</b>				
I	6	40.288±1.679	6.715	0
II	15	36.527±4.587	2.435	0
III	12	43.553±1.368	3.629	17
IV	3	455.986±7.337*	151.995	41
V	3	57.388±1.331	19.129	60
VI	6	271.700±5.515	45.283	0

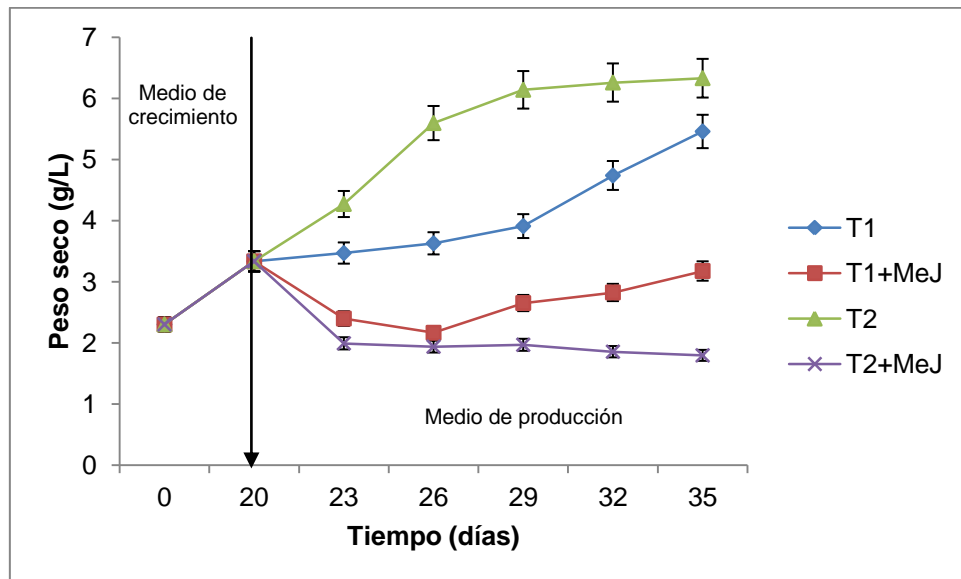
(n=3) X±DE; \*Tukey. TRATAMIENTOS: I (s/CaCl<sub>2</sub>); II (CaCl<sub>2</sub> 0.02 M); III (CaCl<sub>2</sub> 0.2 M); IV (s/CaCl<sub>2</sub> + MeJ 100 µM); V (CaCl<sub>2</sub> 0.02 M + MeJ 100 µM); VI (CaCl<sub>2</sub> 0.2 M + MeJ 100 µM);

### **8.7. Efecto de la inmovilización celular sobre la producción de taxol y taxanos relacionados en los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*.**

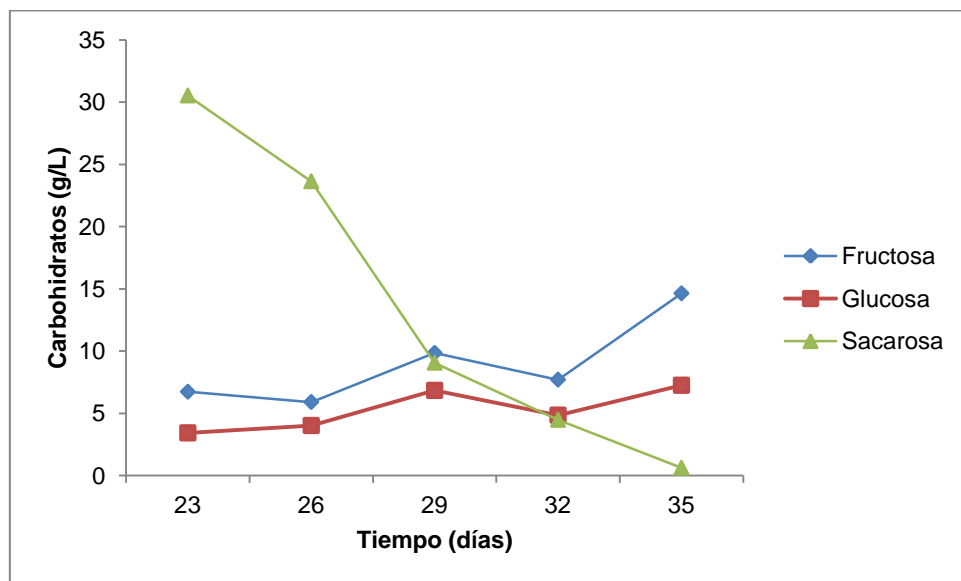
Como ya se ha mencionado el efecto del jasmonato de metilo (MeJ) ha sido ampliamente reportado en los cultivos de *Taxus* para inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios *in vitro*, sin embargo su efecto es inversamente proporcional sobre el crecimiento celular ya que lo inhibe significativamente. En los cultivos de células libres en suspensión de *T. globosa*, observamos que en la segunda fase del cultivo o de producción, no se presentó la típica curva de crecimiento de los cultivos *in vitro*, en este experimento observamos que el crecimiento se inhibió en un 63% por efecto del tratamiento T1 y en un 37 % por efecto del tratamiento T2 en presencia del MeJ, con respecto a los cultivos control; este efecto ha sido reportado para otras especies del género por ejemplo en *T. media* (Cusidó et al. 2002) y en *T. baccata* (Onrubia et al. 2011) (Gráfica 8).

Por otro lado, con respecto al consumo de carbohidratos en los cultivos celulares de *T. globosa*, la sacarosa se desdobla en glucosa y fructosa a partir del día 29 en la segunda fase del cultivo, incrementando su concentración hasta el final de la cinética, este efecto favoreció el crecimiento en las células cultivadas en los dos tratamientos en ausencia del MeJ (Gráfica 9), bajo estas condiciones de cultivo no se afecta la viabilidad celular que fue del 81% (datos no mostrados).





**Gráfica 8.** Cinética de crecimiento celular en los cultivos tipo lote en dos fases, de células en suspensión de *T. globosa*. (n=3)  $X \pm DE$ . Tratamientos: T1 (B5 + 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub>); T1+MeJ (B5 + 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub> + MeJ 100 $\mu$ M); T2 (B5 + PIC, CN y GA<sub>3</sub>); T2+MeJ (B5 + PIC, CN y GA<sub>3</sub> + MeJ 100 $\mu$ M). ↓ Cambio de medio.

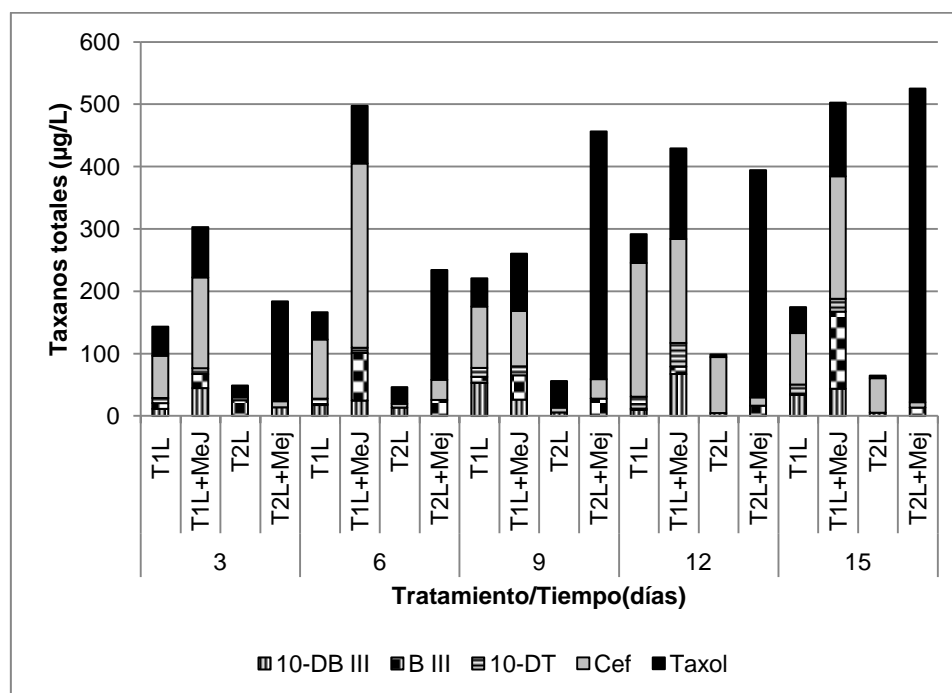


**Gráfica 9.** Consumo de carbohidratos en células libres en la segunda fase o de producción en los cultivos tipo lote en dos fases, de células en suspensión de *T. globosa*.

La producción, del taxol y dos de sus precursores como son la baccatina III y el 10-deacetiltaxol, además del 10-deacetiltaxol y la cefalomanina, se estimuló a lo largo de

las cinéticas en los cultivos tipo lote en dos fases de *T. globosa*. La productividad y el porcentaje de excreción al medio de cultivo de los taxanos: baccatina III (8.260 – 12.788  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ )( 78-84%); 10-deacetilbaccatina III (15  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ); 10-deacetiltaxol (3.180  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ )(63%) y cefalomanina (49.272  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ), se estimuló principalmente por efecto del T1 en los cultivos de células libres y estimulados con MeJ, a partir del tercer día y hasta al final de la segunda fase de la cinética (Tabla 9).

Con respecto al efecto específico de cada tratamiento, observamos que el T2 y en presencia de MeJ estimuló significativamente la concentración del taxol entre 7 (397.387  $\mu\text{g/L}$ ) y 8 (503.158  $\mu\text{g/L}$ ) veces a partir del noveno día de cultivo en fase de producción, con respecto a línea celular de origen (59.6  $\mu\text{g/L}$ ), se incrementó la productividad entre 7 y 13 veces más (29.335 y 53.316  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ), que la productividad de línea de origen (4.26  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ).



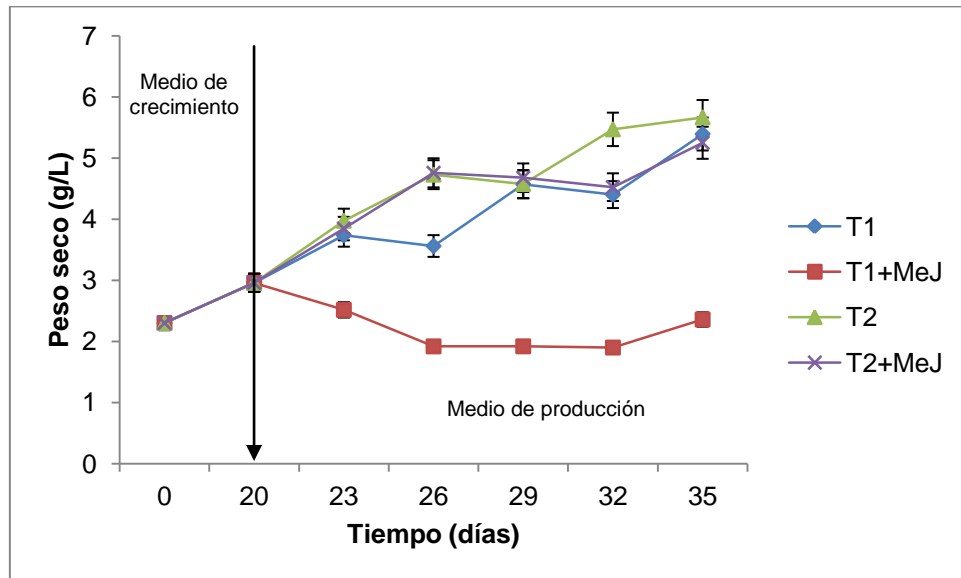
**Grafica 10.** Producción de taxanos totales en los cultivos tipo lote en dos fases, de células en suspensión de *T. globosa*. Datos correspondientes a la segunda fase o de producción: (T1) medio B5 + 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub> y (T2) medio B5 + PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L), con y sin MeJ (100 $\mu\text{M}$ ). (n=3). **10-DB III**: 10-deacetilbaccatina III; **B III**: baccatina III; **10-DT**: 10-deacetiltaxol; **Cef**: cefalomanina.

**Tabla 9.** Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de taxanos en los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de *T. globosa*.

Tratamiento	Tiempo (días)	Concentración (µg/L)	Productividad (µg/L día <sup>-1</sup> )	Excreción %
<b>Taxol</b>				
T2+MeJ	3	159.949±0.991	53.316	2
T2+MeJ	6	176.008±5.564	29.335	18
T2+MeJ	9	397.387±3.156	44.154	8
T2+MeJ	12	364.638±4.939	30.387	9
T2+MeJ	15	503.158±11.907	33.544	8
<b>Baccatina III</b>				
T1+MeJ	6	76.728±0.005	12.788	84
T1+MeJ	15	123.899±0.008	8.260	78
<b>10-deacetilbaccatina III</b>				
T1+MeJ	3	45.006±0.001	15.002	0
T1	9	52.859±0.543	5.873	0
T1+MeJ	12	67.421±0.005	5.618	3
T1+MeJ	15	43.883±0.003	2.926	0
<b>10-deacetiltaxol</b>				
T1+MeJ	12	38.161±0.002	3.180	63
T1+MeJ	15	20.533±0.003	1.369	61
<b>Cefalomanina</b>				
T1+MeJ	3	146.167±0.002	48.722	10
T1+MeJ	6	295.633±0.003	49.272	9
T1	12	215.001±0.004	17.917	6
T1+MeJ	15	196.202±0.003	13.080	8

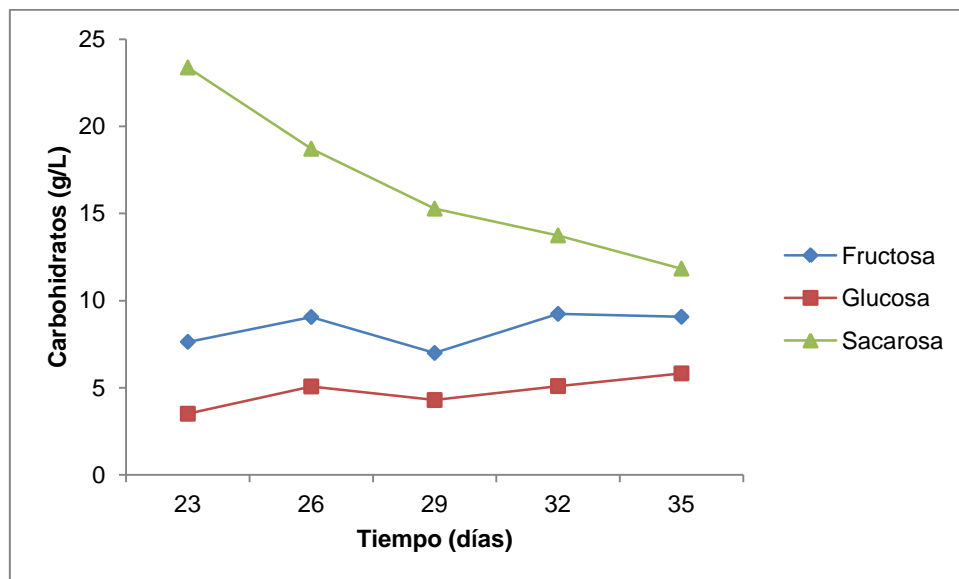
(n=3) X±DE; Tratamientos: T1 (B5 + 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub>); T1+MeJ (B5 + 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub> + MeJ 100µM); T2 (B5 + PIC, CN y GA<sub>3</sub>); T2+MeJ (B5 + PIC, CN y GA<sub>3</sub> + MeJ 100µM).

Para la inmovilización celular de los cultivos celulares de *T. globosa*, fue importante determinar la concentración adecuada de alginato de sodio para la formación de las perlas en medio WPM, para el tejo mexicano fue de 3.5 %, con esta concentración se obtuvieron perlas de forma y tamaño adecuado para realizar los experimentos. En los cultivos de células inmovilizadas, el crecimiento celular se estimuló por efecto de los dos tratamientos (T1 y T2), en ausencia del MeJ, por otro lado, cuando éste se añade, el crecimiento decrece considerablemente en los cultivos en medio B5 añadido del tratamiento T1 principalmente. En el tratamiento T2 se estimula el crecimiento celular tanto en células libres como inmovilizadas de *T. globosa* (Gráfica 11).



**Gráfica 11.** Cinética de crecimiento celular en los cultivos tipo lote en dos fases, de células inmovilizadas de *T. globosa*. (n=3)  $\bar{X} \pm DE$ . Tratamientos: T1 (B5 + 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub>); T1+MeJ (B5 + 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub> + MeJ 100 $\mu$ M); T2 (B5 + PIC, CN y GA<sub>3</sub>); T2+MeJ (B5 + PIC, CN y GA<sub>3</sub> + MeJ 100 $\mu$ M). ↓ Cambio de medio.

Con respecto al consumo de carbohidratos en los cultivos de células inmovilizadas de *T. globosa*, pudimos observar que la sacarosa se degrada muy lentamente en la segunda fase o de producción, sin que se llegue a consumir totalmente al final de la cinética (11,833 g/L). Con respecto a la glucosa y fructosa, se observa un incremento en su concentración hasta el final del cultivo, estos carbohidratos podrían estar involucrados en el crecimiento que se observa de los cultivos de *T. globosa* (Gráfica 12), y en la estimulación de la biosíntesis de los diferentes taxanos que se acumulan en los cultivos como lo podemos observar más adelante.

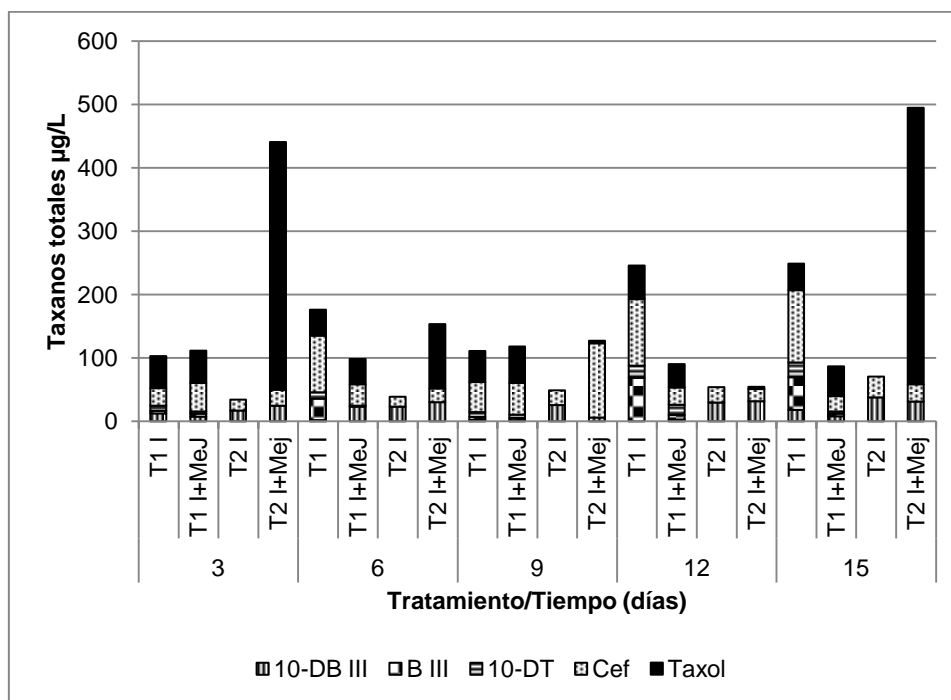


**Gráfica 12.** Consumo de carbohidratos en la segunda fase o de producción, en los cultivos tipo lote en dos fases, de células inmovilizadas de *T. globosa*. (n=3).

Con respecto a la producción de taxanos en células inmovilizadas, pudimos observar que la concentración de los taxanos en general decrete a lo largo de la segunda fase del cultivo (Gráfica 13). Sin embargo, el tratamiento T2 añadido de MeJ, estimuló 7.3 (436.336  $\mu\text{g/L}$ ) y 6.5 (391.041  $\mu\text{g/L}$ ) veces la producción de taxol con respecto a línea celular de origen (59.6  $\mu\text{g/L}$ ). Por otro lado, logramos estimular por efecto de la inmovilización celular en combinación del cultivo en dos fases, la excreción al 100% de la baccatina III, 20% a la cefalomanina y a la 10-deacetil-baccatina III, y un 76% al 10 deacetil-taxol, principalmente por efecto del tratamiento T1 sin estimular, a partir del 6 día de la segunda fase de cultivo (Tabla 10). Semejantes resultados han sido reportados por Bentebibel et al. en (2005) y por Bonfill et al., en (2007) con respecto a *T. baccata*, en los que incrementan la producción de taxol 2 veces y 3 veces para baccatina III por efecto de la inmovilización y estimulación con jasmonato de metilo.

Actualmente se sabe que tanto el crecimiento celular como la producción de los metabolitos secundarios *in vitro* depende de la fuente de carbono empleado. Por otro lado, la concentración de la fuente de carbono en el medio, influye principalmente en la biosíntesis, mismo que varía entre las diferentes especies de *Taxus* (Hirasuna et al. 1996). En los cultivos de células libres e inmovilizadas de *T. globosa* en la segunda fase del cultivo,

observamos que la sacarosa, fructosa y glucosa actuaron de manera sinérgica estimulando tanto del crecimiento celular como la biosíntesis del taxol principalmente el medio B5 añadido de PIC y de la KN, en presencia del MeJ (100µM).



**Gráfica 13.** Producción de taxanos totales en los cultivos tipo lote en dos fases, de células inmobilizadas de *T. globosa*. Datos correspondiente a la segunda fase o de producción: **(T1)** medio B5 añadido de 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub> y **(T2)** medio B5 añadido de PIC (2 mg/L), CN (0.1 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L), con y sin MeJ (100µM). (n=3). **10-DB III**: 10-deacetilbaccatina III; **B III**: baccatina III; **10-DT**: 10-deacetiltaxol; **Cef**: cefalomanina.

**Tabla 10.** Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de taxanos en los cultivos tipo lote en dos fases, de células inmovilizadas de *T. globosa*.

Tratamiento	Tiempo* (días)	Concentración ( $\mu\text{g/L}$ )	Productividad ( $\mu\text{L día}^{-1}$ )	Excreción %
<b>taxol</b>				
T2+MeJ	3	391.041 $\pm$ 7.831	130.347	1
T2+MeJ	6	101.524 $\pm$ 0.483	16.921	4
t2+MeJ	15	436.336 $\pm$ 2.742	29.089	1
<b>baccatina III</b>				
T1	6	33.913 $\pm$ 0.003	5.652	100
T1	12	68.824 $\pm$ 0.015	5.735	86
T1	15	51.494 $\pm$ 0.013	3.433	77
<b>10-deacetilbaccatina III</b>				
T2+MeJ	6	30.345 $\pm$ 0.108	5.058	19
T2	12	29.788 $\pm$ 0.246	2.482	0
T2	15	37.697 $\pm$ 0.010	2.513	20
<b>10-deacetiltaxol</b>				
T1	6	10.076 $\pm$ 0.005	1.679	45
T1	12	18.909 $\pm$ 0.005	1.576	12
T1	15	22.855 $\pm$ 0.003	1.524	76
<b>cefalomanina</b>				
T1	6	89.216 $\pm$ 0.003	14.869	22
T2+MeJ	9	116.771 $\pm$ 1.026	12.975	0
T1	12	105.055 $\pm$ 0.003	8.755	22
T1	15	114.163 $\pm$ 0.006	7.611	27

(n=3)  $\bar{X} \pm \text{DE}$ ; Tratamientos: T1 (B5 + 2,4-D, BAP y  $\text{GA}_3$ ); T1+MeJ (B5 + 2,4-D, BAP y  $\text{GA}_3$  + MeJ 100 $\mu\text{M}$ ); T2 (B5 + PIC, CN y  $\text{GA}_3$ ); T2+MeJ (B5 + PIC, CN y  $\text{GA}_3$  + MeJ 100 $\mu\text{M}$ ).

## 9. CONCLUSIONES

1. Se establecieron los cultivos de callos a partir de explantes de hojas de *T. globosa* en medio B5 y WPM los cuales presentaron un tiempo de duplicación de 13.81 y 13.2 días y un IC de 0.44 y 0.7 respectivamente.
2. Los cultivos de callos de *T. globosa* produjeron cuatro de los cinco taxanos marcadores del género, la cefalomanina no se produjo en este tipo de cultivo.
3. Los taxanos que se acumularon en mayor concentración en callos cultivados en medio B5 fueron el 10-deacetiltaxol (80.82  $\mu\text{g/g}$  PS) seguido por el taxol (50  $\mu\text{g/g}$  PS)
4. El contenido total de taxanos en callos de *T. globosa* cultivados en medio B5 fue dos veces mayor (50  $\mu\text{g/g}$  PS) que en los callos cultivados en medio WPM (24  $\mu\text{g}$ ).
5. Se establecieron los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*, a partir de callos friables derivados de hoja y se determinó que el tamaño de inóculo de 50 g PF/L es el adecuado para estimular el crecimiento celular, en los cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa*.
6. El mejor medio de cultivo para estimular el crecimiento celular en *T. globosa*, fue el medio WPM, con el que se obtuvo un tiempo de duplicación 2.32 d.
7. El jasmonato de metilo (100  $\mu\text{M}$ ) inhibió el crecimiento celular de los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*.
8. En los cultivos tipo lote de células en suspensión de *T. globosa*, el medio de cultivo WPM añadido de MeJ (100  $\mu\text{M}$ ), incrementó 3.32 veces la producción de taxol (197.999  $\mu\text{g/L}$ ), sus precursores (baccatina III; 10-deacetilbaccatina III) y el 10-deacetiltaxol. Por el contrario, la cefalomanina (91.428  $\mu\text{g/L}$ ), fue el único taxano que incrementó su producción por efecto del medio B5 sin estimular.
9. En la segunda fase de cultivo tipo en dos fases, el crecimiento celular fue directamente proporcional a la concentración de  $\text{CaCl}_2$  (0.2 M) aún en presencia del MeJ (100  $\mu\text{M}$ ).



10. La productividad del taxol ( $22.596 \mu\text{g/L día}^{-1}$ ) se incrementó 5 veces por efecto del tratamiento II ( $\text{CaCl}_2$  0.02M), con respecto a la línea de origen ( $4.256 \mu\text{g/L día}^{-1}$ ).
11. Se determinó para el tejo mexicano, la concentración adecuada de alginato de sodio para la formación de las perlas en medio WPM que fue de 3.5 %, con esta concentración se obtuvieron perlas de forma y tamaño adecuado para inmovilizar a las células en suspensión.
12. El crecimiento celular tanto de los cultivos libres como inmovilizados de células en suspensión de *Taxus globosa* se inhibió por efecto del jasmonato de metilo, en la segunda fase del cultivo.
13. Con respecto al consumo de carbohidratos en los cultivos libres de células en suspensión de *T. globosa*, la sacarosa decrece considerablemente al tiempo 29 de la segunda fase consumiéndose en su totalidad al final de la cinética, por otro lado, tanto la concentración de la fructosa como glucosa se acumulan en mayor proporción que al inicio de la segunda fase del cultivo.
14. Por otro lado, en los cultivos celulares inmovilizados, tanto la sacarosa como la fructosa y glucosa se consumen parcialmente durante la segunda fase del cultivo.
15. La sacarosa es el carbohidrato que prefieren los cultivos de células en suspensión e inmovilizadas de *T. globosa* para estimular el crecimiento celular *in vitro*.
16. La fructosa y la glucosa acumuladas en el medio de cultivo, durante la segunda fase, estimularon de manera sinérgica, la biosíntesis del taxol y taxanos relacionados en combinación con el jasmonato de metilo y el tipo de tratamiento.
17. En los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de *T. globosa*, el tratamiento T2 (B5+ PIC, CN y  $\text{GA}_3$ ) añadido del jasmonato de metilo ( $100 \mu\text{M}$ ), estimuló de manera intracelular la producción de taxol, desde el inicio y hasta el final de la segunda fase del cultivo.

18. La producción de baccatina III, la 10-deacetilbaccatina III, el 10-deacetiltaxol y la cefalomanina, se estimuló por efecto del tratamiento T1 (B5 + 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub>) añadido de MeJ (100 µM).
19. Al inmovilizar los cultivos de células en suspensión de *T. globosa* se incrementó la velocidad de biosíntesis del taxol, obteniendo una productividad de 130.347 µg/L día<sup>-1</sup>, además de un 20% de excreción de la 10-deacetilbaccatina III, por efecto del Tratamiento 2 (B5+ PIC, CN y GA<sub>3</sub>) añadido del jasmonato de metilo (100 µM).
20. Mediante la inmovilización celular y por efecto del tratamiento T1 (B5 + 2,4-D, BAP y GA<sub>3</sub>) sin MeJ, se estimuló la excreción principalmente de los otros taxanos como son: la baccatina III (100%), el 10-deacetiltaxol (76%) y de la cefalomanina (22 al 27 %).

## 10. DISCUSIÓN

*Taxus globosa* Schltdl (tejo mexicano) es la única especie del género *Taxus* que crece en la República Mexicana (Zavala et al. 2001) y es una de las cuatro especies del género con mayor contenido de taxol y taxanos relacionados, los cuales se acumulan principalmente en las hojas y tallos de los árboles silvestres (van-Rozendaal et al. 1999; Soto et al. 2000). Este árbol se caracteriza por su lento crecimiento y poca densidad poblacional por lo que se le considera una especie protegida por la SEMARNAT (Soto et al. 2000).

A partir del año 2000, se reporta por primera vez tanto por investigadores en México (Soto et al. 2000) como en Holanda (van-Rozendaal et al. 2000), el estudio fitoquímico de la especie y se corroboran sus actividades biológicas (Soto et al. 2000). Dada la importancia de la especie y al peligro en el que se encuentra desde el punto de vista biológico debido a su baja densidad poblacional y lento crecimiento, en este trabajo de investigación se iniciaron los cultivos *in vitro* con la finalidad de obtener una alternativa viable para la obtención de taxol y taxanos relacionados, sin afectar a la especie en su hábitat y así contribuir a su conservación. Para ello se estableció la metodología de desinfestación de material de tallo y hoja de *T. globosa* mediante el uso de desinfectantes como etanol, cloro en combinación con fungicidas, en donde se obtuvo de un 89 a 97 % de desinfestación respectivamente, valores semejantes a lo obtenido por Correa et al. (2006) en el establecimiento del cultivo de *T. baccata* (96%).

### ***Inducción de callogénesis.***

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* de callos de *T. globosa* se evaluó el efecto del medio Woody Plant Medium (WPM) y del medio Gamborg (B5) ampliamente utilizados para el establecimiento de cultivos *in vitro* de otras especies de *Taxus* (Wu et al. 2001; Brunakova et al. 2004; Pérez et al. 2004; Correa et al. 2006; Khosroushahi et al. 2006).

En *T. globosa* el medio B5 añadido de 2,4-D, CN y GA<sub>3</sub> estimuló en un tiempo de 20 días la inducción de callogénesis a partir de explantes de hojas y tallos, con lo cual se disminuyó el tiempo de inducción reportado por Barrales et al. (2006) de 40 días,

estimulando el 100% de desdiferenciación de los explantes de hoja y un 80% a partir de explantes de tallo, este porcentaje de inducción ha sido reportado para *T. baccata* tanto en medio B5 como en medio MS (Mihalhevic et al. 2002; Correa et al. 2006). Es posible que la desdiferenciación de los explantes haya ocurrido por efecto de la auxina 2,4-D que actuó en las zonas meristemáticas ubicadas en las nervaduras de los explantes de hojas, también estimuladas por las zonas de corte, lo que incrementó la división celular e inhibiendo la morfogénesis y dando como resultado la rápida formación de callo (Álvarez, 2001).

### ***Establecimiento de los cultivos de callo.***

Al caracterizar los cultivos de callos de *T. globosa* cultivados en medio B5 añadido de PIC, CN y GA<sub>3</sub> presentaron un índice de crecimiento (IC) de 0.44 y un tiempo de duplicación (td) de 13.81 días, en cambio, los callos cultivados en medio WPM que contenían los mismos reguladores de crecimiento tuvieron mayor IC (0.70) con respecto al medio B5 con td de 13.2 días. Este tiempo de duplicación ha sido reportado en otras especies de *Taxus* como son *T. baccata* (Correa et al. 2006), *T. chinensis* (Pérez et al. 2004), *T. globosa* (Barrios et al. 2009), *T. x media* (Hirasuna et al. 1996), *T. baccata* y *T. x media* (Wickremesinhe et al. 1993). A partir de los cultivos de callos derivados de hojas de *T. globosa* cultivados tanto en el medio WPM como en B5 se logró estimular la producción por primera vez del taxol, así como de sus precursores la baccatina III y 10-deacetilbaccatina III y un taxano más el 10-deacetiltaxol. La mayor producción de taxol se obtuvo en el medio B5 durante la primera semana de cultivo (50 µg/g PS), esta producción fue el doble y se obtuvo en menor tiempo que lo reportado por Barrios et al. (2009) (26 µg/g PS) en cultivos de callos derivados de brotes de *T. globosa* y estimulados con cloruro de clorocolina a los 40 días del cultivo.

### ***Establecimiento de los cultivos de células en suspensión.***

Los cultivos de células en suspensión se establecieron a partir de callos friables derivados de hojas de *T. globosa*. Una vez establecidos los cultivos líquidos de *T. globosa*, se determinó el mejor tamaño de inóculo para optimizar el crecimiento celular, evaluando tres tamaños inóculo. El tamaño de 50 g PF/L fue el adecuado para establecer los cultivos de celulares de *T. globosa*, los cuales presentaron un IC de 0.65 y un td de 3.9 días. Este tamaño de inóculo es 50% menor a lo reportado para otras especies de *Taxus* (100 g PF/L),

por ejemplo *T. chinensis* (Wang et al. 2001), *T. media* (Cusido et al. 2002; Bonfill et al. 2003) y *T. baccata* (Expósito et al. 2009a; Onrubia et al. 2011) y cuatro veces menor que lo reportado para *T. yunnanensis* (200 g PF/ L) (Zhang et al. 2002).

### ***Efecto de la estimulación en los cultivos tipo lote de células en suspensión de T. globosa.***

La estimulación es un proceso para inducir o aumentar la biosíntesis de metabolitos secundarios de las plantas, debido a la adicción de pequeñas cantidades de estimuladores de diverso origen. La producción de taxanos en cultivos celulares de varias especies de *Taxus* se ha mejorado con éxito por medio del uso de estimuladores, en particular por el jasmonato de metilo (MeJ) en el caso de taxol (Malik et al. 2011).

En nuestro trabajo de investigación, los cultivos de células en suspensión de *T. globosa* se establecieron en dos medios de cultivo WPM y B5, además de evaluar el efecto de la estimulación con MeJ sobre la producción de taxanos. Los cultivos de células en suspensión con respecto a los cultivos de callo, produjeron los cinco taxanos marcadores de la especie. En estos cultivos el medio que estimuló el crecimiento celular fue el WPM con el que se obtuvo un IC de 6.14 y un td de 2.32 días, y por efecto de la estimulación del jasmonato de metilo estimuló en mayor concentración al taxol (197.999 µg/L), y tres taxanos más como son 10-deacetilbaccatina III (633.724 µg/L) 10-deacetiltaxol (229.611 µg/L) y baccatina III (160.622 µg/L), esta producción es del mismo orden con respecto a lo que ha sido reportado en algunas líneas celulares derivadas de *Taxus* estimuladas con jasmonato de metilo. La productividad del taxol (0.014 mg/L día<sup>-1</sup>) en los cultivos de células en suspensión de *T. globosa* se encuentra en el mismo orden de magnitud aunque en menor concentración, reportada para otras especies de *Taxus* estimuladas con jasmonato de metilo, por ejemplo en *T. baccata* (0.55 mg/L día<sup>-1</sup>) Bentebibel *et al.*, 2005 y *T. wallichiana* (0.87 mg/L día<sup>-1</sup>) Navia-Osorio *et al.*, 2002.

Como resultado de esta primera etapa del trabajo de investigación, se delimitó el tamaño de inóculo adecuado para la obtención de líneas celulares derivadas de callos friables de hojas de *T. globosa*, que fueron productoras de taxol y cuatro taxanos

marcadores del género. También se establecieron las condiciones de cultivo para estimular el crecimiento celular y la producción y excreción de cada uno de los taxanos a partir de cultivos tipo lote de células en suspensión de *Taxus globosa*.

***Efecto de la estimulación con Ca<sup>2+</sup> y MeJ en los cultivos tipo lote en dos fases de células en suspensión de T. globosa.***

Diversas estrategias biotecnológicas, tales como la selección de líneas de alto rendimiento de células, la manipulación de los medios de cultivo, las condiciones de cultivo, la inmovilización celular, y estimulación se han empleado para mejorar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. En la mayoría de las células de la planta, la producción de los metabolitos secundarios no está asociada con el crecimiento celular, por lo que los metabolitos secundarios se producen a menudo en condiciones de estrés o al final del ciclo de crecimiento, es decir, durante la fase estacionaria. Los cultivos en dos fases generalmente, las células se cultivan primero en un medio rico en nutrientes adecuado para el crecimiento (fase I) y luego se transfieren a un medio de producción de metabolitos secundarios donde se pueden añadir estimuladores, precursores o compuestos inductores de estrés (fase II) (Malik et al. 2013).

El Ca<sup>2+</sup> y MeJ son de los estimuladores que se reportan para inducir la biosíntesis del metabolismo secundario *in vitro*, cada uno de ellos afectan la producción de fitoalexinas y metabolitos de interés. El papel de Ca<sup>2+</sup> en la formación de fitoalexinas y metabolitos secundarios se ha investigado usando varios productos químicos que aumentan o disminuyen el Ca<sup>2+</sup> intracelular. Por otro lado, se sabe también que el calcio en altas concentraciones, estimula en el retículo endoplasmático la producción de proteínas con actividad secretora. En el caso del MeJ, se reporta que los jasmonatos activan la expresión de los genes de defensa, incluyendo los genes que codifican las enzimas que catalizan la formación de metabolitos secundarios, principalmente en los de origen triterpénico y fenólico.

Además, el Ca<sup>2+</sup> y el MeJ también interactúan en la modulación de la respuesta de defensa, y esto se debe a que el calcio juega un papel en la mediación de la biosíntesis del jasmonato, induciendo la actividad de lipoxigenasa, enzima involucrada en su biosíntesis (Zhao y Sakai, 2003).

Como resultado de nuestros experimentos anteriores, donde observamos que el medio WPM estimula el crecimiento celular y el medio B5 la excreción de los taxanos al medio de cultivo, se decidió evaluar por primera vez en cultivos líquidos de *T. globosa*, la estrategia de cultivos tipo lote en dos fases y la estimulación con calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en combinación del jasmonato de metilo (MeJ).

Al evaluar el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  y del MeJ sobre el crecimiento celular en peso seco, en los cultivos tipo lote en dos fases de *T. globosa*, observamos que el MeJ inhibió el crecimiento celular, esto ha sido reportado en otras especies de *Taxus*, por ejemplo *T. media* (Cusidó et al. 2002) y *T. baccata* (Onrubia et al. 2011). Asimismo, el incremento de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo estimuló el crecimiento celular aún en presencia de MeJ, estos resultados difieren a lo reportado en otros cultivos vegetales tales como *Galphimia glauca* (Osuna et al. 2014), *Siline vulgaris* (Günter y Ovodov, 2005) y *Plumbago rosea* (Komaraiah et al. 2002).

Con respecto a la producción de los taxanos, observamos que el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en combinación del MeJ, incrementó la productividad de 3 taxanos entre ellos: al taxol ( $16.299 - 34.516 \mu\text{g/L día}^{-1}$ ), la baccatina III ( $4.673 - 26.287 \mu\text{g/L día}^{-1}$ ) y la cefalomanina ( $2.435 - 151.995 \mu\text{g/L día}^{-1}$ ) así como su excreción al medio de (41 a 60 %), finalmente en este experimento se inhibió la producción de 10-deacetiltaxol.

### ***Inmovilización celular de los cultivos de T. globosa.***

La inmovilización es una de las estrategias importantes para incrementar la producción de metabolitos secundarios en células. Las células inmovilizadas tienen la ventaja sobre las células en libres en suspensión, porque se proporciona alta concentración de células por unidad de volumen, un mejor contacto entre célula-célula y la protección por el estrés por la agitación, y evita el lavado de células en los subcultivos (Malik et al. 2011).

Para la inmovilización celular de los cultivos celulares de *T. globosa*, fue importante determinar la concentración adecuada de alginato de sodio para la formación de las perlas en medio WPM, para el tejo mexicano fue de 3.5 %, este porcentaje se ubica entre el rango

reportado para otras especies de tjos, como son *T. baccata* (1.5, 2, 2.5 %) (Bonfill et al. 2004, Bentebibel et al. 2007, Malik et al. 2011) y *Galphimia glauca* (5%) (Osuna et al. 2008).

Evaluamos por primera vez en los cultivos celulares del tejo mexicano, el efecto de la inmovilización celular y la estimulación con jasmonato de metilo (MeJ 100  $\mu\text{M}$ ), para ello se utilizó el medio Gamborg B5 (B5) añadido de dos tratamientos diferentes que contenían picloram y 2,4-diclorofenoxiacético, en combinación con cinetina y benzilaminopurina, en cultivos tipo lote en dos fases, incrementando la productividad y la excreción al medio de cultivo de 4 taxanos.

Mediante este experimento, la producción de los taxanos se estimuló principalmente, por efecto del tratamiento T1 en los cultivos de células libres y estimulados con MeJ, a partir del tercer día y hasta al final de la segunda fase de la cinética la baccatina III (8.260-12.7888  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ) (81%); 10-deacetilbaccatina III (15  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ); 10-deacetiltaxol (3.180  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ) (62%) y la cefalomanina (49.272  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ). Sin embargo, la productividad del taxol (53  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ) se obtuvo por efecto del tratamiento T2 añadido de MeJ de manera intracelular, el tiempo de la biosíntesis *in vitro* del taxol disminuyó de 15 días a 3 días en la fase de producción, incrementando al doble su productividad (130.347  $\mu\text{g/L día}^{-1}$ ) en los cultivos de células inmovilizadas y estimuladas con MeJ de *T. globosa*.

Nuestros resultados indican que para estimular la producción de los precursores del taxol (baccatina III y 10-deacetilbaccatina III) además de la cefalomanina y el 10-deacetiltaxol no es necesario inmovilizar los cultivos de células en suspensión de la especie, estos resultados difieren con respecto a lo reportado por Bentebibel et al. (2005) y Bonfill et al. (2007) en *T. baccata*, para baccatina III, donde reportan un incremento de 3 veces su producción por efecto de la inmovilización y estimulación con jasmonato de metilo, Sin embargo para incrementar la biosíntesis del taxol *in vitro* se obtiene por efecto de la inmovilización celular y del estímulo del jasmonato de metilo, en sinergia con las fuentes de carbono utilizadas en esta investigación (sacarosa, glucosa y fructosa).

Una vez optimizado la producción de los compuestos anticancerígenos se puede escalar la producción hasta el nivel industrial.



## 11. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación sobre la producción de taxol y taxanos relacionados en los cultivos de células en suspensión de *T. globosa*, se hace necesario continuar con el estudio *in vitro* de tan importantes metabolitos con actividad biológica con la finalidad de incrementar aún más su producción.

Por lo que dentro de las perspectivas de investigación se plantea lo siguiente:

- Incrementar la producción 10 veces más con respecto a la productividad que obtuvimos en este trabajo de investigación, utilizando la estrategia de cultivo en dos fases y evaluando otros tipos de estimuladores, por ejemplo con coronatina y metil- $\beta$ -ciclodextrina.
- Evaluar el efecto de estimuladores abióticos, por ejemplo la luz, que ya ha sido reportado que estimula la producción de taxanos en árbol silvestre, expuestos a la incidencia solar.
- Una vez optimizada la producción de taxol y taxanos relacionados, escalar la producción a bioreactor.
- A la par, se propone realizar los estudios genómicos de la especie para aislar los genes que se expresan en las líneas productoras de los diferentes taxanos.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour-Ezquivel A, Vincent EJ (1994) Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Centro Agropecuario Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica.
- Álvarez AB (2001) Reguladores de crecimiento vegetal. En: Hurtado MDV, Merino MME Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Trillas. pp 48-66.
- Barradas-Dermitz DM, Hayward-Jones PM, Mata-Rosas M, Palmeros-Sanchez B, Platas-Barrdas BJO, Velasquez-Toledo RF (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.
- Barrales CHJ, Soto HRM, Ramos VAC, Trejo TLI, Martínez VM, Ramírez GME, San Miguel CR, Luna PGR, López UJ (2011) Extracción y cuantificación de taxoides por HPLC en hojas *in situ* y en callos inducidos *in vitro* de *Taxus globosa* Schlecht. *Span J Rural Dev* 2:103-114.
- Barrios H, Zhang YL, Sandoval C, Xiao ZA (2009) Increase of taxol production in *Taxus globosa* Shoot Callus by Chlorocholine Chloride. *Open Nat Prod J* 2:33-37.
- Bentebibel S, Moyano E, Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Eibl R, Pinol MT (2005) Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on taxol and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnol Bioeng* 89(6):647-655.
- Bestoso F, Ottaggio L, Armirotti A, Balbi A, Damonte G, Degan P, Mazzei G, Cavalli F, Ledda B, Miele M (2006) In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce taxol and taxanes. *BMC Biotechnol* 6:45.

- Besumbes O, Sauret-Gueto S, Phillips MA, Imperial S, Rodriguez-Concepcion M, Boronat A (2004) Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of taxol. *Biotechnology and Bioengineering* 88(2): 168–175.
- Bonfill M, Bentebibel S, Moyano E, Palazón J, Cusidó RM, Eibl R, Piñol MT (2007) Paclitaxel and baccatin III production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cells of *Taxus baccata*. *Biología Plantarum* 51(4):647-652.
- Bonfill M, Exposito O, Moyano E, Cusidó RM, Palazón J, Piñol T (2006) Manipulation by Culture Mixing and Elicitation of paclitaxel and Baccatin III production in *Taxus baccata* suspension cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42: 422-426.
- Bonfill M, Palazón J, Cusidó RM, Joly S, Morales C, Piñol MT (2003) Influence of elicitors on taxane production and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in *Taxus media* cells. *Plant Physiol Biochem* 41:91-96.
- Bonfill M, Cusidó RM, Palazon J, Piñol MT, Morales C (2002) Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* calluses. *Plant Cell Tiss Org Cult* 68: 73-78
- Brown JT and Charlwood BV (1990) Organogenesis in callus culture. *Methods Mol Biol* 6: 65-70.
- Brodelius P, Nilson K (1983) Permeabilidad of immobilized plant cells, resulting in realese of intracellularly stored products with preserved cell viability. *European J Appl Microbiol Biotechnol* 17:275-280.
- Brunakova K, Babincovaz Z, Takac M, Cellarova E. 2004. Selection of callus cultures of *Taxus baccata* L. as a potential source of paclitaxel production. *Engi Life Sci* 4(5): 465-469.

- Chau M, Croteau R (2004) Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 2a-hydroxylase involved in taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 427:48–57.
- Chau M, Jennewein S, Walker K, Croteau R (2004) Taxol biosynthesis: molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxoid 7b-hydroxylase. *Chem Biol* 11:663–672.
- Chen WM, Zhang PL, Wu B, Zheng QT (1991) Studies on the chemical constituents of *Taxus yunnanensis*. *Yao xue xue boo* 26(10):747-754.
- Cheong JJ, Choi YD (2003) Methyl jasmonato as a vital substance in plants. *Trends Genet* 19(7): 409-413.
- Costabel F, Kurz WG (1996) Cell Differentiation and Secondary Metabolism Production. En: Soh W. H. y Bhojwani S. S. (Eds.). *Morphogenesis in Plant Cell Cultures*. Academia Press, U. S. A. p. 301-304.
- Correa MY, Niño J, Mosquera MO (2006) Cuantificación de taxol y baccatina III en callos de *Taxus baccata* por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). *Scientia et Technica* 12 (32): 431-435.
- Croteau R, Ketchum REB, Long RM, Kaspera R, Wildung MR (2006) Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem Rev* 5:75-97.
- Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Expósito O, Moyano E, Piñol MT (2007) Source of isopentenyl diphosphate for taxol and baccatin III biosynthesis in cell cultures of *Taxus baccata*. *Biochem Eng J* 33:159-167.
- Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales Carmen, Piñol MT (2002) Improved paclitacel and baccatin II production in suspensión cultures of *Taxus media*. *Biotechnol Prog* 18:418-423.

- Cruz Vega Delia Elva (1996) Determinación de la actividad estabilizadora de microtúbulos de fracciones ricas en diterpenoides obtenidas mediante HPLC de extractos de hojas, tallos y corteza de *Taxus globosa*. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- De Vries HJ y Egberg C (1979) High-pressure liquid chromatographic determination of carbohydrates in food products: evaluation of a method. *J Assoc Off Anal Chem* 62(6):1292-1296.
- Diario Oficial de la Federación de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, 30 de Diciembre de 2010.
- Duncan DR, Widholm JM (1990) Measurements of viability suitable for plant tissue cultures. *Methods Mol Biol* 6: 29-37.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(13):6431-6436.
- Expósito O, Syklovska-Baranek K, Moyado E, Onrubia M, Bonfill M, Palazón J, Cusidó RM (2010) Metabolic responses of *Taxus media* transformed cell cultures to the addition of methyl jasmonate. *Biotechnol Prog* 26(4): 1145-1153.
- Expósito O, Bonfill M, Onrubia M, Jané A, Moyado E, Cusidó RM, Palazón J, Piñol MT (2009a) Effect of taxol feeding on taxol and related taxane production in *Taxus Baccata* suspension cultures. *N Biotechnol* 25(4):252-259.
- Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili, Cusidó RM, Palazón J (2009b) Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anticancer Agents Med Chem* 9(1):109-121.

- Fett-Neto AG, DiCosmo F (1992) Distribution and amounts of taxol in different shoot parts of *Taxus cuspidata*. *Plant Med* 58(5):464-466.
- Feria-Romero I, Lazo E, Ponce-Noyola T, Cerda-García-Rojas CM, Ramos-Valdivia AC (2005) Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Biotechnol Lett.* 27(12): 839-843.
- Floss HG, Mocek U (1995) Biosynthesis of taxol. En: Suffness M., editor. *Taxol: Science and applications*. Boca Raton (USA): CRC Press, pp. 191-208.
- Furmanowa M, Glowniak K, Syklovska-Baranek K, Zgórk G, Józefczyk A (1997) Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x media* var. *Hatfieldii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 49:75–79.
- Gillet F, Roisin C, Fliniaux MA, Jacquín-Dubreuil A, Barbotin JN, Nava-Saucedo JE (2000) Immobilization of *Nicotiana tabacum* plant cell suspensions within calcium alginate gel beads for the production of enhanced mounts of scopolin. *Enzyme Microb Technol* 26:229-234.
- Guerrero B, Castillo J, Aguilar MI, Delgado G (2000) 5 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 9 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 13 $\alpha$ -pentaacetoxy-4(20), Taxadieno (7 $\beta$ -acetoxy-Taxusin) and Other Constituents from the Bark of the Mexican Yew, *Taxus globosa* (Taxaceae). *Rev Soc Quím México* 44:2:148-150.
- Günter EA, Ovodov YS (2005) Effect of calcium, phosphate and nitrogen on cell growth and biosynthesis of cell wall polysaccharides by *Silene vulgaris* cell culture. *J Biotechnol.* 117(4):385-93.
- Guo BH, Kai GY, Jin HB, Tang KX (2006) Taxol synthesis. *Afr J Biotechnol* 5 (1):015-020.
- Gurbuz I, Erdemoglu N, Yesilada E, Sener B (2004) Anti-ulcerogenic lignans from *Taxus baccata* L. *Z Naturforsch C.* 59(3-4):233-236.

- Hefner J, Ketchum REB, Croteau R (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for taxol production. *Arch Biochem Biophys* 360:62–74.
- Hefner J, Rubenstein SM, Ketchum REB, Gibson DM, Williams RM, Croteau R (1996) Cytochrome p450-catalyzed hydroxylation of taxa-4(5),11(12)-dien to taxa-4(20),11(12)-dien-alpha-ol. The first oxygenation step in taxol biosynthesis. *Chem Biol* 3:479-489.
- Hirasuna TJ, Pestchanker LJ, Srinivasan V, Shuler ML (1996) Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 44:95-102.
- 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.
- Holton RA, Kim HB, Somoza C, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, Shindo M, Smith CC, Kim S (1994a) First total synthesis of taxol 1. Functionalization of the B ring. *J Am Chem Soc* 116: 1597-1598.
- Holton RA, Kim HB, Somoza C, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, Shindo M, Smith CC, Kim S (1994b) First total synthesis of taxol 2. Completion of the C and D rings. *J Am Chem Soc* 116: 1599-1560.
- Hu F, Huang J, Xu Y, Quian X, Zhong JJ (2006) Responses of defenses signals, biosynthetic gene transcription and taxoid biosynthesis to elicitation by a novel synthetic jasmonate in cell cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol Bioeng* 94(6): 1064-1071.
- Huang Q, Roessner CA, Croteau R, Scott AI (2001) Engineering *Escherichia coli* for the Synthesis of Taxadiene, a Key Intermediate in the Biosynthesis of Taxol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9(9): 2237–2242.

- Jennewein S, Long RM, Williams RM, Croteau R (2004) Cytochrome P450 taxadiene 5 $\alpha$ -hydroxylase, a mechanistically unusual monooxygenase catalyzing the first oxygenation step of taxol biosynthesis. *Chem Biol* 11:379-387.
- Jennewein S, Rithner ChD, Williams RM, Croteau R (2003) Taxol metabolism: Taxoid 14 $\beta$ -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Arch Biochem Biophys* 413:262-270.
- Jennewein S, Rithner ChD, Williams RM, Croteau R (2001) Taxol biosynthesis: Taxane 13 $\beta$ -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Aca Sci USA* 98(24):13595-13600.
- Jennewein S, Croteau R (2001) Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 13-19.
- Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev* 4: 253-265
- Ketchum REB, Gibson DM, Gallo LG (1995) Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 42:185–193.
- Khosroushahi AY, Naderi-Manesh H, Simonsen HT (2011) Effect of antioxidants and carbohydrates in callus cultures of *Taxus brevifolia*: Evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production. *BiolImpacts* 1(1):37-45.
- Khosroushahi AY, Valizadeh M, Ghasempour A, Khosrowshahli H, Naghdibadi, Dadpour MR, Omid Y (2006) Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biol Int* 30:262-269.
- Kingston DG (2000) Recent advances in the chemistry of taxol. *J Nat Prod* 63(5):726-734.
- Kim CH, Kim KI, Chung IS (2000) Expression of modified green fluorescent protein in suspension culture of *Taxus cuspidata*. *J Microbiol Biotechnol* 10:91-94.



- Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC (2006) Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* 54(6):2327-32.
- Komaraiah P, Ramakrishna S, Reddanna P, Kavi Kishor P. (2003). Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and in situ adsorption. *J Biotechnol* 101(2): 181-187.
- Koyama J, Morita I, Kobayashi N, Hirai K, Simamura E, Nobukawa T, Kadota S (2006) Antiallergic activity of aqueous extracts and constituents of *Taxus yunnanensis*. *Biol Pharm Bull* 29(11):2310-2312.
- Küpeli E, Erdemoglu N, Yesilada E, Sener B (2003) Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. *J Ethnopharmacol* 89(2):265-270.
- Lansing A, Haertel M, Gordon M, Floss HG (1991) Biosynthetic studies on taxol. *Planta Medica* 57(2):83.
- Lee-Parsons CW, Erturk S (2005) Ajmalicine production in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures depends on  $Ca^{2+}$  level. *Plant Cell Rep* 24(11):677-82.
- Long RM, Lagisetti C, Coates RM, Croteau R (2008) Specificity of the Nbenzoyl transferase responsible for the last step of taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 477:384-9.
- Long RM, Croteau R (2005) Preliminary assessment of the C13-side chain 2'-hydroxylase involved in taxol biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 338:410-7.
- Luna-Palencia GR, Cerda-García-Rojas CM, Rodríguez-Monroy M, Ramos-Valdivia AC (2005) Influence of auxins and sucrose in monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* cell suspension cultures. *Biotechnol Prog* 21(1):198-204.
- Magnani M, Maccari G, Andreu JM, Días JF, Botta M (2009) Possible binding site for paclitaxel at microtubule pores. *FEBS Journal* 276: 2701-2712

- Malik S, Hossein Mirjalili M, Fett-Neto AG, Mazzafera P, Bonfill M (2013) Living between two worlds: two-phase culture systems for producing plant secondary metabolites. *Critical Crit Rev Biotechnol* 33(1):1-22.
- Malik S, Cusidó RM, Mirjalili MH, Moyado E, Palazón J, Bonfill M (2011) Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochem* 46:23-34.
- Markman M, Rowinsky E, Hakes T, Reichman B, Jones W, Lewis JL, Rubin S, Curtin J, Barakat R, Phillis M (1992) Phase I trial of intraperitoneal taxol: a Gynecology Group study. *J Clin Oncol* 10(9):1485-1491.
- McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenstein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, Donehower DC (1989) Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 111: 273-279.
- Mihaljevic S, Bjedov I, Kovac M, Lavanic DL, Jelaska S (2002) Effect of explant source and growth regulators on *in vitro* callus growth of *Taxus baccata* L. *Washingtonii*. *Food Technol Biotechnol* 40(4): 299-303.
- Miller RW, Powell RG, Smith CR, Arnold E, Clardy J (1981) Antileukemic alkaloids from *Taxus wallicheana* Zucc. *J Org Chem* 46(7): 1469-1474.
- Moon WJ, Yoo BS, Kim DI, Byun SY (1998) Elicitation kinetics of taxane production in suspension cultures of *Taxus baccata* Pendula. *Biotechnol Tech* 12:79–81.
- Navia-Osorio A, Garden H, Cusidó RM, Palazón J, Alfermann AW, Pinol MT (2000a) Production of paclitaxel and baccatin III in a 20-L airlift bioreactor by a cell suspension of *Taxus wallichiana*. *Planta Med* 68(4):336-40.
- Navia-Osorio A, Garden H, Cusidó RM, Palazón J, Alfermann AW, Pinol MT (2002b) Taxol® and Baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in a airlift bioreactor. *J Plant Physiol* 159:97-102.

- Nicolaou KC, Guy RK, Potier P (1996) Taxoids: New weapons against cancer. *Sci Am* 274(6):94-98.
- Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, Guy RK, Claiborne CF, Renaud J, Couladouros EA, Paulvannan K, Sorensen EJ (1994) Total synthesis of taxol. *Nature* 367:630-634.
- Nims E, Dubois CP, Roberts SC, Walker EL (2006) Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metab Eng* 8:385-394.
- Nisar M, Khana I, Simjee SU, Gilani AH, Obaidullah, Perveen H (2008a). Anticonvulsant, analgesic and antipyretic activities of *Taxus wallichiana* Zucc. *J Ethnopharmacol* 116(3):490-494.
- Nisar M, Khan I, Ahmad B, Ali I, Ahmad W, Choudhary MI (2008b) Antifungal and antibacterial activities of *Taxus wallichiana* zucc. *J Enzyme Inhib Med Chem* 23(2):256-260.
- O'Shaughnessy JA, Cowan KH (1994) Current status of Paclitaxel in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 33: 27-37.
- Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Exposito O, Palazon J, Cusido RM (2011) An approach to the molecular mechanism of methyl jasmonate and vanadyl sulphate elicitation in *Taxus baccata* cell cultures: The role of txs and bap1 gene expression. *Biochem Eng J* 53:104-111.
- Onrubia M, Expósito O, Benítez-García I, Mangas S, Cusido RM, Palazon J (2010) *Taxus* sp. source of anticancer agent taxol. Editores Awaad AS, Govil JN, Singh V. Book Drug plants pp.161-184; Recent Progress in medical Plants, Vol. 27
- Osuna L, Tapia N, Zamilpa A, Jiménez-Ferrer E, Tortoriello J (2014) Biosynthesis stimulation of nor-secotriterpene anxiolytics in cell suspension cultures of *Galphimia glauca* Cav. *Eng Life Sci* 14: 68-75.

- Osuna L, Moyano E, Mangas S, Bonfill M, Cusidó RM, Piñol MT, Zamilpa A, Tortoriello J, Palazón J (2008) Immobilization of *Galphimia glauca* Cav Plant Cell Suspensions for the Production of Enhanced Amounts of Galphimine-B. *Planta Med* 74(1):94-99.
- Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Morales C (2003) Inhibition of paclitaxel and baccatin III accumulation by mevinolin and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. *J Biotechnol* 101:57-63.
- Pérez N, Barbón R, Capote A, Jiménez E, Wilken D (2004) Producción de taxoides en callos y suspensiones celulares de *Taxus chinensis* mediante el uso de elicitores abióticos. *Biot Veg* 4(3):171-176.
- Payne GF, Bringi V, Prince CL, Shuler ML (1992) Suspension Culture. Root Cultures and Shoot Cultures. En: John Wiley and Sons (Eds). *Plant Cell and Tissue culture in Liquid Systems*. U. A. S. p. 145-310.
- Piñol M, Palazón J, Cusidó R, Ribó M (1999) Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots. *Plant Sci* 141(1):41-49.
- Richheimer SL, Tinnermeier DM, Timmons DW (1992) High performance liquid chromatographic assay of taxol. *Anal Chem* 64:2323-2326.
- Roberts SC, Naill M, Gibson DM, Schuler ML (2003) A simple method for enhancing paclitaxel release from *Taxus canadensis* cell suspension cultures utilizing cell wall digesting enzymes. *Plant Cell Rep* 21: 1217-1220.
- Rowinsky EK, Burke PJ, Karp JE (1989) Phase I and pharmacodynamic study of taxol in refractory acute leukemias. *Cancer Res* 49(16):4640-4647.
- Sanders D, Brownlee C, Harper J (1999) Communicating with Calcium. *Plant Cell* 11:691-706.

- Schiff PB, Horwitz SB (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblasts cells. Proc Natl Acad Sci 77:1561-1565.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature 277:665-667.
- Schoendorf A, Rithner CD, Williams R, Croteau RB (2000) Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10b-hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. Proc Natl Aca Sci USA 98(4):1501-1506.
- Scragg HA (1995) The problems associated with hig biomass levels in plant cell suspension. Plant Cell Tiss Organ Cult 43:163-170.
- Scragg HA (1994) Commercial and technical perspectives. En: Hunter FC (Ed). *in vitro* cultivation of plants cells. Butterworth-Heinemann U.K. pp 151-178.
- Seki M, Ohzora C, Takeda M y Furusaki S (1997) Taxol (paclitaxel) production using free and immobilized cells of *Taxus cuspidate*. Biotechnol Bioeng 53:214-219.
- Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR (1973) Microtubule Assembly in Absence of Added Nucleotide. Proc Natl Acad Sci USA 70:765-768.
- Smith RH (1986) Establishment of calli and suspension cultures. EN: Weissbach A, Weissbach H (eds) Methods in Enzimology 188: 539-549.
- Snyder JP, Nettles JH, Cornett B, Downing KH, Nogales E (2001) The binding conformation of taxol in B-tubulin: A model based on electron crystallographic density. Proc Natl Aca Sci 98(9): 5312-5316
- Soto M, Sanjurjó M, González MT, Cruz D, Giral F (2000) El Tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.) Potencial de su aprovechamiento en taxol. Ciencia Ergo Sum 7(3):277-279.
- Spjut RW (2007) Taxonomy and nomenclature of *Taxus*. J Bot Res Inst Texas 1(1):203-289.

- Srinivasan V, Ciddi V, Bringi V, Shuler ML (1996) Metabolic inhibitors, elicitors and precursors as tools for probing yield limitation in taxane production by *Taxus chinensis* cell cultures. *Biotechnol Progr* 12:457-465.
- Stohs SJ (2004) Taxol in cancer treatment and chemoprevention. En: Bagchi D y Preuss HG, editors, *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention*. Boca Raton (USA): CRC Press pp 519-540.
- Strobel GA, Stierle A, Hess WM (1993) Taxol Formation in Yew - *Taxus*. *Plant Sci* 92:1-12.
- Swindell CS, Krouss NE, Horwitz SB (1991) Biologically active taxol analogues with detected a ring dide chain substituents and variable C-2' configurations. *J Med Chem* 34:1176-1184.
- van Rozendaal ELM, Lelyveld GP, van Beek TA (2000) Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related taxoids. *Phytochemistry* 53:383-389.
- van Rozendaal ELM, Kurstjens SJL, van Beek TA, van den Berg RG (1999) Chemotaxonomy of *Taxus*. *Phytochemistry* 52:427-433.
- Vongpaseuth K, Roberts SC (2007) Advancements in the understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture. *Curr Pharm Biotechnol* 8:219-236.
- Walker K, Fujisaki S, Long R, Croteau R (2002a) Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12715-20.
- Walker K, Long R, Croteau R (2002b) The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9166-71.

- Walker K, Schoendorf A, Croteau R (2000) Molecular cloning of taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol-Oacetyl-transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys 374:371-380.
- Walker K, Croteau R (2000a) Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl CoA:taxane-2 $\alpha$ -O-benzoyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 97:13591–13596.
- Walker K, Croteau R (2000b) Molecular cloning of a 10-deacetylbaocatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 97:583–587.
- Walker k, Croteau R (1999) Taxol biosynthesis: a review of some determinant steps. Rec Adv Phytochem 33:31-50
- Wall ME, Wani MC (1996) Camptothecin and taxol: discovery to clinic. J Ethnopharmacol 51(1-3):239-253.
- Wang YD, Yuan YJ y Wu JC (2004) Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. Biochem Eng J 19: 259-265.
- Wang YJ, Yuan M, Lu JC, Wu JC, Jiang JL (2003) Inhibitor studies of isopentenyl pyrophosphate biosynthesis in suspension cultures of the yew *Taxus chinensis* var. *mairei*. Biotechnol Appl Bioc 37:39-43.
- Wang YD, Yuan YJ, Wu JC (2003) Translocation of isopentenil pyrophosphate for taxol biosynthesis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74:283-288.
- Wang C, Wu J, Mei X (2001) Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Appl Microbiol Biotechnol 55:404-410

- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971) Plant antitumor agents. VI The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc 93(9):2325-2327.
- Wasternac C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. Ann Bot 100: 681-697.
- Wheeler AL, Long RM, Ketchum REB, Rithner CD, Williams RM, Croteau R (2001) Taxol biosynthesis: differential transformations of taxadien-5 $\alpha$ -ol and its acetate ester by cytochrome P450 hydroxylases from *Taxus* suspension cells. Arch Biochem Biophys 390(2):265-278.
- Wickremesinhe ERM and Arteca RN (1993) *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. Plant Cell Tissue Organ Cult 35:181-193.
- Wildung MR, Croteau R (1996) A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. J Biol Chem 271:9201-9204.
- Wilson CR, Sauer JM, Hooser SB (2001) Taxines: a review of mechanism and toxicity of yew (*Taxus* spp.) alkaloids. Toxicol 39(2-3):175-185.
- Wink M (1999) Introduction biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. En: Wink M (Ed.). Biochem Plant Rev, Vol. 2 Sheffield Acad Press U.K. p. 1-16.
- Wu J, Wang C, Mei X (2001) Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* ssp cell cultures by rare earth chemical lanthanum. J Biotechnol 85: 67-73.
- Xu LX, Liu AR (1989) Determination of taxol in extract of *Taxus chinensis* by reversed phase HPLC. Yao Xue Xue Bao 24: 552-555.



- Yang S, Lu SH y Yuan YJ (2008) Lipidomic analysis reveals differential defense responses of *Taxus cuspidata* cells to two elicitors, methyl jasmonato and cerium (Ce<sup>4+</sup>). *Biochim Biophys Acta* 1781:123-134.
- Yeoman MM, Holden MA, Corchet P, Holden PR, Goy JR, Hobbs MC (1990) Exploitation of disorganized plant cultures for the production of secondary metabolites. En: *Secondary products from vanillylamine*. (B.V. Charlwood, M.J.C. Rhodes. Eds). Oxford, Clarendon Press, pp. 66-139.
- Yin J, Tezuka Y, Shi SL, Nobukawa M, Nobukawa T, Kadota S (2006) In vivo anti-osteoporotic activity of isotaxiresinol, a lignan from wood of *Taxus yunnanensis*. *Phytomedicine* 13(1-2):37-42.
- Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y (1996) Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biotechnol* 14:1129-1132.
- Zamir LO, Nedeia ME, Belair S, Sauricol F, Mamer O, Jacqmain E, Jean FI, Garneaur FX (1992) Taxanes isolated from *Taxus canadensis*. *Tetra Lett*; 33:5173-5176.
- Zamudio RS (1992) Familia Taxaceae. En: Rzedowski J & G Calderón (eds) *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Fascículo 9. Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Zavala-Chávez F (2002) Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. II: Población de juveniles y algunos datos de semillas. *Ciencia Ergo Sum* 9(2):177-183.
- Zavala-Chávez F (2001) Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. I: Población de adultos y algunas características del hábitat. *Ciencia Ergo Sum* 8(2):169-174.

- Zavala-Chávez F, Soto-Hernández M, Rodríguez-González MT (2001) El romerillo (*Taxus globosa* Schlecht.): biología, dificultades y perspectivas de su uso. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 7(1):77-94.
- Zhang CH, Wu JY, He GY (2002) Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. Appl Microbiol Biotechnol 60:396-402.
- Zhao J, Sakai K (2003) Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced  $\beta$ -thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. J Exp Bot 54:647-656.
- Zhong J.J. (2002) Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. J Biosci Bioeng 94 (6): 591-599.

# **ANEXO**

**Publicación Científica**

*Effect of the culture medium and biotic stimulation on taxane production in Taxus globosa Schltdl in vitro cultures*

**Nadia Tapia, Alejandro Zamilpa, Mercedes Bonfill, Elsa Ventura, Delia Cruz-Vega, Alma Del Villar, Francisco Cruz-Sosa, et al.**

**Acta Physiologiae Plantarum**

ISSN 0137-5881

Acta Physiol Plant

DOI 10.1007/s11738-013-1380-0



 Springer

## Effect of the culture medium and biotic stimulation on taxane production in *Taxus globosa* Schtdl in vitro cultures

Nadia Tapia · Alejandro Zamilpa · Mercedes Bonfill ·  
Elsa Ventura · Delia Cruz-Vega · Alma Del Villar ·  
Francisco Cruz-Sosa · Lidia Osuna

Received: 18 December 2012 / Revised: 14 August 2013 / Accepted: 30 August 2013 / Published online: 25 September 2013  
© Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków 2013

**Abstract** *Taxus globosa* is the only species of the *Taxus* genus that grows in Mexico. In this study, callus cultures from leaves and young shoots of *T. globosa* were established in Gamborg's B5 medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2 mg/L), kinetin (0.5 mg/L) and gibberellic acid (0.25 mg/L). Callus growth and taxane production were evaluated using two culture media: Woody Plant Medium and Gamborg's B5 supplemented with picloram (2 mg/L), kinetin (0.1 mg/L) and gibberellic acid (0.5 mg/L). The effect of the inoculum size (50, 100 and 150 g FW/L) and culture media (Woody Plant Medium and Gamborg's B5) with and without the presence of methyl jasmonate (100  $\mu$ M) on *T. globosa* cell suspensions was assessed. Taxane analysis revealed that the calli in

Gamborg's B5 produced taxol (50  $\mu$ g/g DW), baccatin III, 10-deacetyl baccatin III and 10-deacetyl taxol. Woody Plant Medium also induced the production of taxol, although to a lesser extent. The optimum inoculum size was 50 g FW/L. In cell suspension cultures, both media had a significant effect on taxane production when supplemented with methyl jasmonate. In Woody Plant Medium, at day 14, a total concentration of 197,999  $\mu$ g/L of taxol, 160,622  $\mu$ g/L of baccatin III, 633,724  $\mu$ g/L of 10-deacetyl baccatin III and 229,611  $\mu$ g/L 10-deacetyl taxol were obtained, with total excretion of baccatin III and 10-deacetyl taxol to the culture medium. In Gamborg's B5, cephalomanine was obtained at a concentration of 91,428  $\mu$ g/L without elicitation, and all taxanes were excreted to the medium to a variable extent.

Communicated by M. Capuana.

N. Tapia · A. Zamilpa · L. Osuna (✉)  
Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano  
del Seguro Social (IMSS), Argentina 1, Col. Centro, C.P. 62790  
Xochitotec, Morelos, Mexico  
e-mail: osunalidia@yahoo.com

N. Tapia · F. Cruz-Sosa  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,  
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma  
Metropolitana-Itzapalapa, 09340 Mexico, DF, Mexico

M. Bonfill  
Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona,  
Barcelona, Spain

E. Ventura · A. Del Villar  
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico  
Nacional, Yautepec, Morelos, Mexico

D. Cruz-Vega  
Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, Instituto  
Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, Mexico

**Keywords** Anticancer agent · In vitro cell cultures ·  
Methyl jasmonate · Taxanes · *Taxus globosa*

### Abbreviations

2,4-D	2,4 Dichlorophenoxyacetic acid
WPM	Woody Plant Medium
B5	Gamborg medium
MeJ	Methyl jasmonate
KN	Kinetin
GA <sub>3</sub>	Gibberellic acid
T I	Treatment I
T II	Treatment II
T III	Treatment III
FW	Fresh weight
DW	Dry weight
GI	Growth index
BIII	Baccatin III
DABIII	10-Deacetyl baccatin III
DAT	10-Deacetyl taxol

Ceph Cephalomanine  
PIC Picloram

## Introduction

In vitro cultures are an attractive alternative for obtaining high added value metabolites when these are produced in plants at low concentrations, their chemical synthesis is economically unfeasible, or their semi synthesis is also difficult and expensive (Arias et al. 2009). One of the strategies to consider for in vitro plant secondary metabolite production is the selection of productive species or explants that naturally accumulate the target compounds (Exposito et al. 2010).

The diterpenoid compound Paclitaxel (Taxol®) has important anticarcinogenic properties and is produced mainly by species of the *Taxus* genus (Schiff and Horwitz 1979). Production is variable among species and generally occurs at low concentrations, so the most viable option is in vitro culture of callus and cell suspension cultures (Van Rozendaal et al. 1999, 2000).

Various biotechnological strategies have been evaluated in in vitro cultures of different *Taxus* species, including the type of media, supplementation of culture medium with different growth regulators, biotic and abiotic elicitation, and different types of culture techniques such as two-phase culture, immobilized cells and scaling up to bioreactor level (Malik et al. 2011).

*Taxus globosa* Schltdl, mainly known as the “Mexican yew”, is the only *Taxus* species native to Mexico, where it grows in the states of Nuevo Leon, Tamaulipas, San Luis Potosi, Queretaro, Hidalgo, Oaxaca and Chiapas in humid, temperate mountainous habitats at 3,400 m a.s.l. Due to its rarity, caused by slow growth and a low population density, it is considered a protected species by the Ministry of Environment and Natural Resources (SEMARNAT) (Zavala-Chávez 2001). The wild tree *T. globosa* has been studied from the phytochemical point of view since 1973 (Strobel et al. 1993), and the species has been shown to have a high content of taxol and related taxanes, with significant anticancer activity. Unlike other species of the *Taxus* genus, in which taxanes accumulate mainly in the bark, most accumulation in the Mexican yew occurs in the leaves and young stems (Soto-Hernández et al. 2000).

A comparative study of taxane content by Van Rozendaal et al. (2000) showed that *T. globosa* has a particularly high content of taxol (433 µg/g DW) compared with other species of the genus. Other secondary metabolites isolated from *T. globosa* include β-cyosterol, β-cyosteryl-β-D-glucosidase, vanillic acid and a taxane peracetyl

identified as 5α, 7β, 9α, 10β, 13α-Penta acetoxy-4(20), 11-Taxadiene-(7β-Acetoxy-Taxusin) (Guerrero et al. 2000).

Given its important biosynthetic potential, since 2009 various research groups in Mexico have been interested in establishing in vitro cultures of *T. globosa*, and obtaining callus cultures and cell suspensions from the needles and young stems to produce taxol and other taxanes (Barrios et al. 2009; Barradas-Dermitz et al. 2010; Barrales et al. 2011). However, to date, the reported taxane in vitro production in *T. globosa* has been very low compared to other species of the genus, with only traces of taxol and other taxanes being obtained (Barrales et al. 2011), and some cell lines even being completely unproductive (Barradas-Dermitz et al. 2010). More studies on the in vitro production of taxanes in cell cultures of *T. globosa* are, therefore, required. In the work presented here, we first evaluated the nutritional impact of two culture media, Woody Plant Medium (WPM) and Gamborg medium (B5), and elicitation with methyl jasmonate (MeJ) (100 µM) on *T. globosa* cell growth, with the aim of increasing the in vitro production of taxol and related taxanes and their excretion from the producer cells to the culture medium.

## Materials and methods

### Establishment of *T. globosa* in vitro cultures

#### Plant material

Explants were obtained from leaves and young stems of wild *T. globosa* collected in Hidalgo State (Mexico) in October and December 2010. The explants were surface-sterilized and after stripping the needles, longitudinally halved stem sections (length 0.8–1.0 cm) and leaves were inoculated onto hormone-free Gamborg medium (B5) (Gamborg et al. 1968) for 20 days to verify the absence of bacteria and fungi. To obtain calli from the aseptic explants, leaves and stems were then cultured for 2 months in B5 supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (2 mg/L), kinetin (KN) (0.5 mg/L), gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (0.5 mg/L) and sucrose (3 %), and solidified with 0.3 % phytigel (Sigma) (TI), or B5 supplemented with picloram (PIC) (2 mg/L), KN (0.1 mg/L), GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) and sucrose (3 %), and solidified with 0.3 % phytigel (TII). The cultures were maintained at 25 ± 2 °C in the dark. The established calli were then subcultured every 10 or 12 days on B5 supplemented with 2,4-D (2 mg/L), benzyl aminopurine (BAP) (0.1 mg/L), GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) and sucrose (3 %), and solidified with 0.3 % phytigel (TIII) until a high biomass of friable calli was obtained (Cusidó et al. 2002).

#### Measuring growth and taxane production in *T. globosa* calli

To determine the kinetics of growth and production in two different basal media, 500 mg FW of calli was inoculated onto petri dishes containing 20 mL of WPM (McCown and Lloyd 1981) with sucrose (1 %) + fructose (1 %), or B5 with sucrose (3 %), both media being supplemented with the growth regulators PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L), and solidified with 0.3 % phytagel. To determine the growth measured as fresh weight (FW), 20–25 callus pieces grown in each culture media were harvested every week during a culture period of 6 weeks, and weighed separately. Dry weight (DW) was recorded from lyophilized callus pieces. The growth parameters of growth index (GI) and average doubling time (dt) were established based on the FW (Brunakova et al. 2004). The dry plant material was extracted to analyze the taxane content following the methodology described below.

#### Establishing *T. globosa* cell suspension cultures

*T. globosa* cell suspension cultures were established by inoculating 10 g FW calli into a 250-mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of WPM supplemented with PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L). The cultures were maintained in a rotary shaker at 100 rpm in the dark at 25 °C for 12 or 15 days, until sufficient biomass was obtained for subsequent studies.

#### Inoculum size

Growth kinetics was measured in the *T. globosa* cell suspensions established to determine the inoculum size for an optimum growth. We evaluated the following inoculum sizes: 50, 100, and 150 g FW/L. Cells were cultured in WPM supplemented with PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L) for 30 days. The flasks were shaken (110 rpm) at 25 ± 2 °C in the dark. Triplicate samples were taken every 3 days. The measured variables were: fresh and dry weight, GI, viability, final volume of the medium and high resolution liquid chromatography (HPLC) quantification of taxanes in the biomass and culture medium (Zhang et al. 2002).

#### Effect of methyl jasmonate (MeJ) elicitation of *T. globosa* cell suspension cultures

The effect of two basal media, WPM and B5, both supplemented with PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L), on cell growth and taxane production, with and without MeJ, was evaluated. The previously established *T. globosa* cells were filtered and those with the optimized inoculum size (50 g FW/L) were placed into 125 mL

Erlenmeyer flasks with 10 mL of the indicated media. MeJ (Aldrich) (100 μM) (Exposito et al. 2010) was dissolved first in ethanol (Yukimune et al. 1996) and then in the culture medium. It was sterilized by filtering through 0.22 μm sterile acrodisc (PALL) and added at the beginning of the culture. Cell suspensions were shaken at 110 rpm on an orbital shaker at 25 ± 2 °C in the dark for 20 days. Three samples from each type of culture conditions were harvested every 3 days. The growth parameters were measured and taxane production was determined from the dry biomass and culture medium in which the *T. globosa* cells were growing. Taxane analysis of the samples was performed by HPLC.

#### Cell viability

The cell viability in all the culture conditions was studied using the method described by Duncan and Widholm (1990). The results are expressed as the percentage of living cells from the total cells.

#### Taxane analysis

##### Taxane extraction from cells and culture medium

50 mg DW samples of powdered freeze-dried biomass were placed in glass tubes, mixed with 2 mL of hexane and left at room temperature. After 12 h, the samples were centrifuged at 2,500 rpm for 20 min and the supernatants were removed. The pellet was extracted with 1 mL of MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) by sonication for 1 h at room temperature, centrifuged at 2,500 rpm for 20 min and the supernatants were removed to other glass tubes. The extracts were dried at 25 °C under vacuum and redissolved in 1 mL of dichloromethane plus 1 mL of distilled water. After vortexing for 10 s and centrifuging at 2,500 rpm for 20 min, the organic fraction was separated and vacuum dried. The dried extracts were resuspended in methanol and filtered prior to analysis (0.22 μm PVDF filters, Millipore, Billerica, MA, USA). The methanol extracts were stored at –20 °C for subsequent HPLC quantification.

For the extraction of taxol and other taxanes from the culture medium, 20 mL of medium was added to 5 mL of dichloromethane and after stirring for 2 min, the organic extract was dried at 60 °C in a rotary evaporator. The dry extract was redissolved in 500 μL of methanol HPLC grade, and stored at –20 °C for subsequent HPLC quantification.

##### Quantification of taxanes by high resolution liquid chromatography (HPLC)

The production of taxol and other taxanes was determined following the methodology described by Richheimer et al. (1992). For quantification, standards were dissolved in

HPLC grade MeOH for analysis. The mobile phase used was  $\text{CNCH}_3\text{:H}_2\text{O}$  (25:75) in a gradient system. The runs were performed for 20 min and the flow of the gradient was 1 mL/min. Samples were analyzed at a wavelength of 225 nm. The injection volume was 20  $\mu\text{L}$  in a LiChrospher RP<sub>18</sub> column (5  $\mu\text{m}$ ). Taxol and other taxanes were identified by an external standard method, using mark patterns Hanser Chemicals (USA) and Sigma (USA).

## Results and discussion

### Establishment of callus cultures

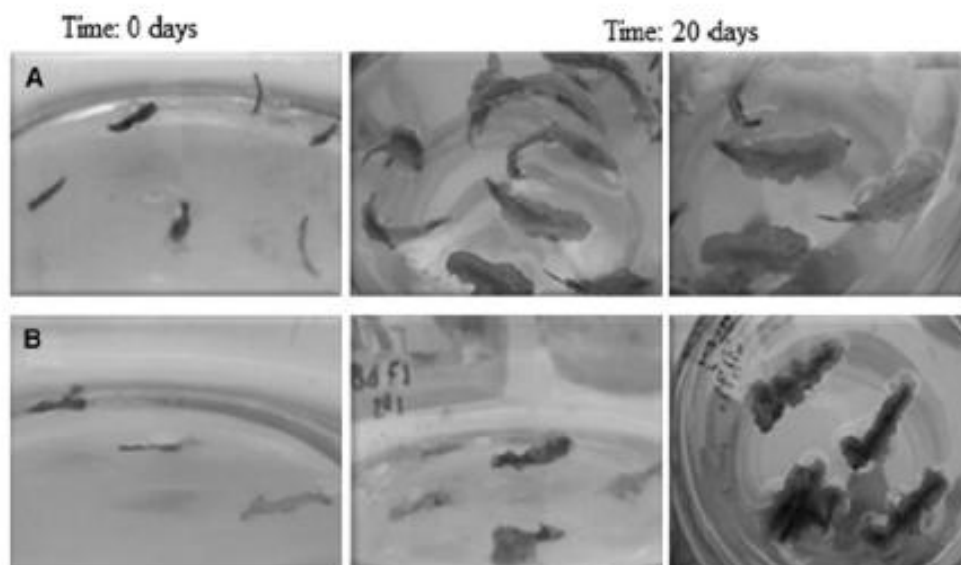
The sterilization process used in this experiment was more effective for leaves than stems, 97 and 89 % of respective explants being without contamination after 15 days. Two different auxins (2,4-D and PIC) at the same concentration, Media TI and TII, were assayed for callus development. Calli were obtained after 20 days in both media, but with varying success. In TI (Fig. 1), the percentage of leaves and stem forming calli was 100 and 80 %, respectively, while in TII it was no higher than 40 %. The calli obtained from leaves were more light-colored and friable than those established from stems. It is possible that the dedifferentiation of leaf explants was due to the effect of the auxin 2,4-D on meristematic areas of petioles and the apex of the leaves, which increased cell division by inhibiting morphogenesis and resulted in an early callus formation. In contrast, the induction of calli from stems was lower.

The percentage of callus induction in the Mexican yew was similar to that reported by other authors in the European yew, for example, 96 % callus induction from young *T. baccata* stems after 20 days in B5 medium (Correa et al. 2006), and 85 % from embryos and 100 % from shoots in MS medium (Mihaljevic et al. 2002).

To increase the biomass, the calli obtained from leaves were routinely subcultured in TIII medium. We have previously observed that 2 mg/L 2,4-D promotes the growth of *Panax ginseng* calli, increases friability and inhibits organogenesis (Bonfill et al. 2002). The synthetic auxin 2,4-D is known to be a general promoter of biomass formation since it induces cell dedifferentiation leading to callus development (Brown and Charlwood 1990). BA was used as the cytokinin because it has proven very effective for the growth of cell cultures of several *Taxus* species: *T. baccata* (Moon et al. 1998; Palazón et al. 2003), *T. cuspidata* and *T. canadensis* (Vongpaseuth and Roberts 2007), *T. cuspidata* (Nims et al. 2006), and *T. brevifolia* (Kim et al. 2000; Khosroushahi et al. 2011) as well as other plant cell cultures, such as *Alstroemeria* (Lin et al. 2000), and *Pinus caribaea* (Akaneme and Encobong 2008).

### Growth and taxane production of *T. globosa* calli

Friable calli obtained as described above were selected with the aim of determining their capacity for growth and taxane production in the two different basal media described in "Materials and methods". The effectiveness of PIC in promoting cell growth in *Taxus* sp is well established



**Fig. 1** Different stages of callus formation from leaves (a) and stems (b) of *T. globosa* in B5 medium (TI)

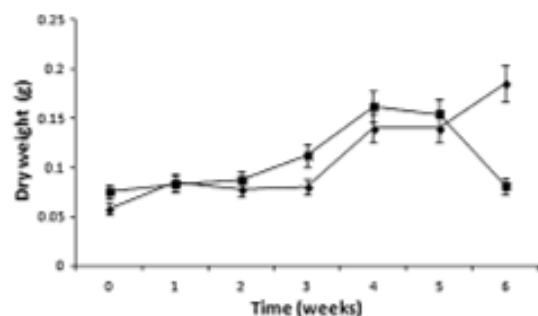


(Furmanowa et al. 1997; Ketchum et al. 1995). In addition, after assaying 48 different media, we have previously shown that optimum improvement of taxol production in *T. baccata* cell cultures is achieved by combining growth regulators used in the current work (Palazón et al. 2003).

As shown in Fig. 2, *T. globosa* calli grown in WPM achieved the highest growth after 4–6 weeks of culture, with a growth index (GI) of 0.70 and an average doubling time (dt) of 13.2 days. When calli were grown in B5 medium, the highest growth was observed at week 4. After this point, the cells entered the stationary growth phase, which lasted 1 week, decreasing thereafter. In both assayed media, the lag phase lasted at least 2 weeks. In B5 medium, the GI was 0.44 and the dt was 13.8 days.

The average dt obtained in the callus cultures was within the range reported for other *Taxus* species: *T. globosa* (14 days) (Barrios et al. 2009), *T. media* (14 days) (Hirasuna et al. 1996), *T. media* and *T. baccata* (13 days) (Wickremesinhe and Arteca 1993).

The calli grown in both media produced taxanes throughout the time period studied. Total taxane content at the end of the experiment (6 weeks of culture) in calli grown in B5 was more than two times higher than in WPM-cultured calli. The main taxane found in calli grown in B5 was 10-DAT followed by taxol. After phytochemical screening of the calli, it was observed that taxol production occurred in cycles, and not at a constant rate during the culture period. Taxol production and accumulation in WPM-cultured calli occurred mainly in the first week (16 µg/g DW) and week 6 (24 µg/g DW). In contrast, the production of 10-deacetyl taxol in these cultures remained constant throughout the culture, accumulating at levels similar to taxol (23.87 µg/g DW). Meanwhile, taxol production and accumulation in B5-cultured calli peaked in the first week (50 µg/g DW) (Table 1).



**Fig. 2** Time course of biomass accumulation (expressed as DW) of *T. globosa* calli cultured in WPM or B5 medium, both supplemented with growth regulators: PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L). Data represent average values from 10 replicates ± SD. Filled diamond WPM; filled square B5

**Table 1** Taxane contents (expressed as µg/g DW) of *T. globosa* calli grown in B5 or WPM, both supplemented with growth regulators: PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L), after 6 weeks of culture

Medium	Taxol	BIII	10-DAB III	10-DAT	Ceph	Total
B5	50	38.06	8.73	80.82	0	177.61
WPM	24	22.03	16.02	23.87	0	85.92

BIII bacatin III, 10-DAB III 10-deacetyl bacatin III, 10-DAT 10-deacetyl taxol, Ceph cephalomanine

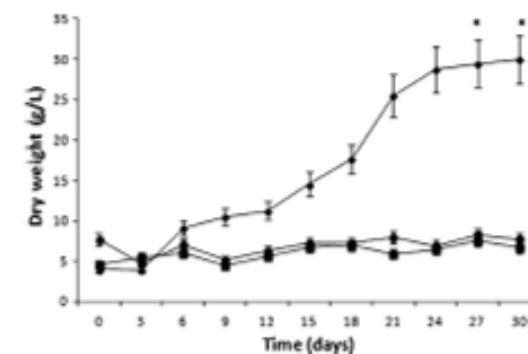
The production of taxol and related taxanes obtained in *T. globosa* callus cultures was double that reported by Barrios et al. (2009), and significantly higher than that reported by Barrakes et al. (2011).

#### Optimizing the inoculum size in *T. globosa* cell suspensions

To establish *T. globosa* cell suspensions with good growth, three different inoculum sizes (50, 100 and 150 g FW/L) were assayed in WPM. During 30 days, the color of the cultures was observed to change from light yellow to reddish. This effect was especially noticeable when the inoculum was 100 and 150 g FW/L, together with the formation of red-brown cell aggregates.

As shown in Fig. 3, the size of the inoculum determined the growth capacity of cultures. In cultures started with the higher inocula (100 and 150 g FW/L), the biomass increased very little during the 30-day period, the highest growth being only 18.5 % of the maximum achieved by cell cultures inoculated with 50 g FW/L. The GI corresponding to cell suspensions inoculated with 50 g/L of cells was 6.5, with a dt of 3.9 days.

All three cultures showed a capacity to produce taxol and related taxanes. Table 2 presents the highest levels



**Fig. 3** Effect of inoculum size on cell growth in batch cultures of *T. globosa* cells in suspension in WPM medium supplemented with PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L) and GA<sub>3</sub> (0.5 mg/L).  $n = 3 \pm$  DE. \* $p < 0.0001$ ; Treatments: filled diamond 50 g FW/L; filled square 100 g FW/L; filled circle 150 g FW/L

**Table 2** Effect of inoculum size (FW) on taxane production in *T. globosa* cell suspension cultures

Inoculum g FW/L	Taxol		Baccatin III		10-DAB III		Cephalomanine		10-DAT	
	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L. day}^{-1}$	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L. day}^{-1}$	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L. day}^{-1}$	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L. day}^{-1}$	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L. day}^{-1}$
50	60.389	5.032	136.217	22.703	524.391	87.398	23.836	3.973	155.301	17.256
100	56.079	3.739	159.777	5.918	467.808	77.968	0	0	945.709	105.079
150	24.959	1.040	57.171	2.722	655.887	109.315	0	0	1,126.337	62.574

10-DAB III 10-deacetyl baccatin III, 10-DAT 10-deacetyl taxol

obtained of each taxane and their respective volumetric productivities. In cell cultures inoculated with 50 g FW/L of biomass, volumetric productivities were higher (except for 10-deacetyl baccatin III and 10-deacetyl taxol) than those of the other inoculum sizes studied and the 5 target taxanes were only found with this inoculum (Table 2). Moreover, when using 50 g of cells, the highest taxane content was generally obtained earlier than when starting with 100 and 150 g FW/L of cells (data not shown). Taxane excretion, although always very low, was also higher with the inoculum of 50 g FW/L (data not shown).

It was inferred from these results that the optimum inoculum size to stimulate cell growth and taxane production in the species *T. globosa* is 50 g FW/L. This inoculum size is four times smaller than that used in other *Taxus* species, e.g., *T. yunnanensis* (200 g FW/L) (Zhang et al. 2002).

#### Effect of methyl jasmonate (MJ) elicitation on *T. globosa* cell suspensions

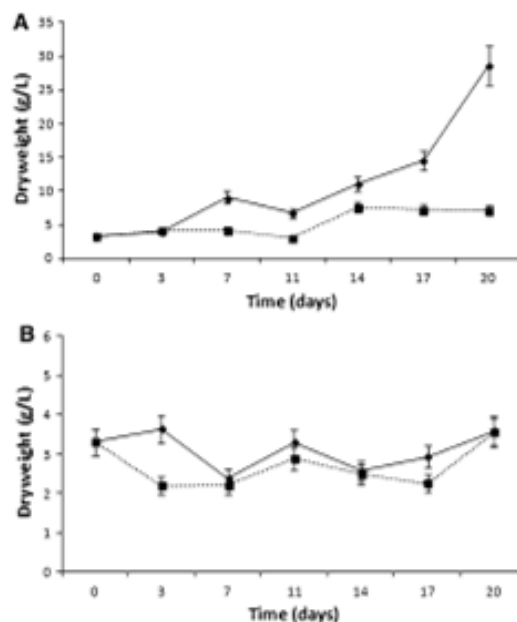
Elicitation is a process of induced or enhanced plant biosynthesis of secondary metabolites due to the addition of trace amounts of elicitors. Taxane production in cell cultures of several *Taxus* species has been successfully enhanced by elicitors, particularly MeJ in the case of taxol (Malik et al. 2011).

To study the effect of the elicitor methyl jasmonate (MeJ) (100  $\mu\text{M}$ ) on growth and taxane production and the interaction between the elicitor and the basal medium contents, *T. globosa* cell cultures were established in WPM and B5, with and without MeJ, as described in "Materials and methods".

The WPM and B5 media used for the control cultures turned red-brown, which lasted throughout the experiment, whereas those of the elicited cultures remained pale yellow. The biomass corresponding to the WPM cultures turned brown with time in all the conditions assayed, in contrast with cells maintained in B5, which did not darken in either control or elicited conditions. This change in the color of the cultures, also reported in other *Taxus* species (Malik et al. 2011), was mainly due to the intracellular accumulation of phenolic compounds, which was provoked by submitting the cultures to nutritional stress. In our case,

the cell suspension cultures grown in WPM produced the highest quantity of phenolic compounds, which were then excreted to the medium.

The time-courses of biomass formation of *T. globosa* cells when cultured in WPM and B5 are shown in Fig. 4a, b. Cell suspensions in WPM without elicitation presented a lag phase of 3 days and continued growing until the end of the experiment, whereas the presence of the elicitor dramatically inhibited the increase of biomass. The dt in control cultures was 2.32 days and the GI was 6.14, whereas in the MeJ-treated cultures the dt was 3.06 days and the GI 0.77 (Fig. 4a).



**Fig. 4** a Effect of culture medium WPM + PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L),  $\text{GA}_3$  (0.5 mg/L) and MeJ elicitation (100  $\mu\text{M}$ ) on cell growth in *T. globosa* cell suspension cultures.  $n = 3 \pm \text{DE}$ ; \* $p < 0.0001$ ; Treatments: filled diamond WPM; filled square WPM + MeJ. b Effect of the culture medium B5 + PIC (2 mg/L), KN (0.1 mg/L),  $\text{GA}_3$  (0.5 mg/L) and MeJ elicitation (100  $\mu\text{M}$ ) on cell growth in *T. globosa* cell suspension cultures.  $n = 3 \pm \text{DE}$ ; \* $p < 0.0001$ ; Treatments: filled diamond B5; filled square B5 + MeJ

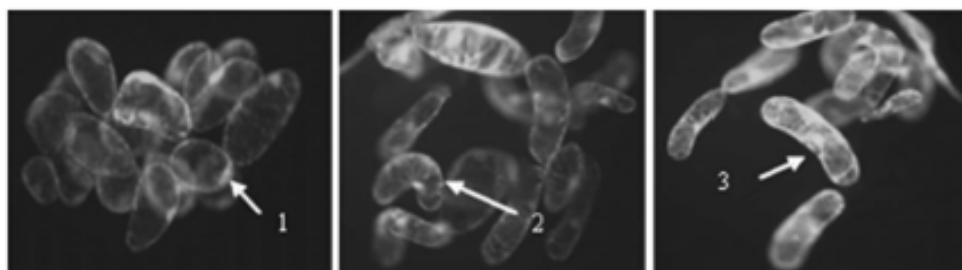


Fig. 5 Different cell morphologies observed in *T. globosa* cell suspensions; 1 Spherical, 2 kidney-shaped, and 3 elongated

Cultures grown in B5 medium did not present significant differences between the control and elicited conditions, the increase of biomass being very low throughout in both cases (Fig. 4b).

Control cells presented three types of morphology throughout the culture: (1) spherical, (2) kidney-shaped, and (3) elongated (Fig. 5). The elicited cultures also presented these three morphologies, although most cells were long and thin, and with a reddish pigmentation. This cellular structure may indicate that MeJ induces an advanced state of development/differentiation in the cells. Initially, the cell viability of cultures was 90 %, which by the end had decreased to 50 and 45 % for control and elicited cultures, respectively.

#### Taxane production in cell suspensions of *T. globosa*

Table 3 shows the contents and productivity of the total taxanes studied (cell-associated plus extracellular) in *T. globosa* cell cultures grown in WPM or B5, with or without MeJ. As can be seen, taxol production was most induced by the effect of WPM supplemented with MeJ. The elicitation of taxane production by MeJ in vitro has been extensively reported for other *Taxus* species (Bonfill et al. 2006; Zhang et al. 2002; Wang et al. 2004).

In WPM the highest total taxol content was observed at day 14: 197.999  $\mu\text{g/L}$ , with a productivity of 14.143  $\mu\text{g/L day}^{-1}$ . The taxol precursors 10-deacetyl baccatin III (633.724  $\mu\text{g/L}$ ) and baccatin III (160.622  $\mu\text{g/L}$ ) also accumulated at the highest concentration at day 20, together with 10-deacetyl taxol (229.611  $\mu\text{g/L}$ ), which was excreted in its entirety into the medium.

Finally, the production of cephalomanine, a taxane with significant cytotoxic activity, was obtained mainly with unelicited B5 medium (91.428  $\mu\text{g/L}$ ), with a productivity of 30.476  $\mu\text{g/L day}^{-1}$ .

In summary, productivity in control conditions was higher in WPM than in B5 for all the taxanes studied except baccatin III and cephalomanine.

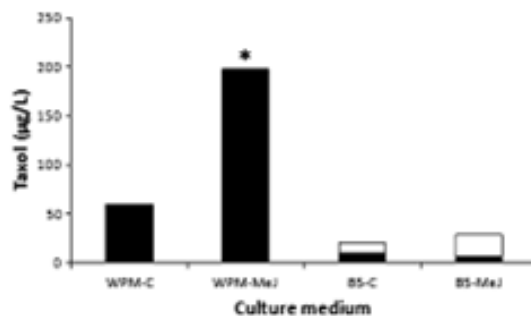
Table 3 Influence of the culture conditions on taxane production in *T. globosa* cell suspension cultures

Culture conditions	Time <sup>a</sup> (days)	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Productivity ( $\mu\text{g/L d}^{-1}$ )	% Excretion
<b>Taxol</b>				
WPM-C	14	59.577	4.256	0
WPM-MeJ	14	197.999	14.143	0
B5-C	17	20.990	1.235	54
B5-MeJ	20	28.683	1.434	77.8
<b>Baccatin III</b>				
WPM-C	20	142.638	7.132	37.2
WPM-MeJ	20	160.622	8.031	100
B5-C	3	36.256	12.085	75.5
B5-MeJ	17	40.898	2.406	85.5
<b>10-Deacetyl baccatin III</b>				
WPM-C	7	520.077	74.297	15.5
WPM-MeJ	14	633.724	45.266	0
B5-C	7	13.195	1.885	87.9
B5-MeJ	17	33.516	1.972	88.7
<b>10-Deacetyl taxol</b>				
WPM-C	7	126.182	18.026	42.1
WPM-MeJ	14	229.611	16.401	0
B5-C	7	9.365	3.935	58.1
B5-MeJ	20	35.882	1.794	69.7
<b>Cephalomanine</b>				
WPM-C	7	23.634	3.376	0
WPM-MeJ	14	23.586	1.685	0
B5-C	3	91.428	30.476	8.3
B5-MeJ	7	28.871	4.124	42.9

Highest taxane concentration (cell-associated plus extracellular taxane contents) and productivity, days of culture when the highest taxane production was achieved and % of taxane excretion from the producer cells to the medium

WPM-C Control WPM, WPM-MeJ WPM supplemented with MeJ (100  $\mu\text{M}$ ), B5-C Control B5 medium, B5-MeJ B5 medium elicited with MeJ (100  $\mu\text{M}$ )

<sup>a</sup> Time in which occur the greater production of the different taxanes, by the effect of each culture conditions



**Fig. 6** Effect of culture media WPM and B5 and MeJ elicitation on taxol production in *T. globosa* cell suspensions. WPM-C, B5-C: Cultures grown in WPM and B5 medium without elicitation; WPM-MeJ and B5-MeJ: Cultures grown in WPM and B5 medium supplemented with MeJ (100 µM). Data represent average values from three separate experiments  $\pm$  SD, \* $p < 0.0001$ . Filled square intracellular; open square extracellular

The best culture conditions for producing taxol (Fig. 6) were found to be WPM supplemented with MeJ. The taxol level achieved in these conditions was 3.4 higher than in the same medium without elicitation and over 9 times higher than in the cultures grown in B5, elicited or not. Moreover, in WPM MeJ elicitation increased the productivity of taxol and baccatin III, but not the other 3 taxanes. However, the taxol biosynthesized by cells grown in WPM was not excreted to the medium. In contrast, cells grown in B5 excreted a high percent of all taxanes to the medium (Table 3), although their productivity was generally lower than in WPM medium (except for cephalomanine and baccatin III).

Briefly, the productivity increase of taxol and baccatin III was achieved using WPM-MeJ and of 10-deacetyl taxol and 10-deacetyl baccatin III using WPM without elicitation.

Taxol production in *T. globosa* in vitro cultures has been studied by three other research groups. Barrios et al. (2009) reported a taxol concentration of 26.9 µg/g DW in callus cultures grown in Schenk and Hildebrandt medium (SH) elicited with chloride choline (CCO) and the group of Barrales et al. (2011), using the medium MS + PIC without elicitation, obtained a taxol, cephalomanine and 10-deacetyl baccatin III production of  $1.33 \times 10^{-2}$  µg/g DW,  $2.98 \times 10^{-3}$  µg/g DW and  $2.77 \times 10^{-2}$  µg/g DW, respectively. These levels of production are lower than those we obtained in unelicited callus cultures.

Furthermore, we increased the concentration of taxol 3.96-fold in cell suspensions, as well as that of baccatin III (4.22-fold), 10-deacetyl baccatin III (39.5-fold), 10-deacetyl taxol (13.93-fold) and cephalomanine, mainly due to the use of WPM in combination with MeJ. Barradas-Dermitz et al. (2010) have recently published a 6.45 mg/L

production of baccatin III but failed to enhance the production of taxol and other taxanes. Our taxol production was also similar to that reported for other *Taxus* species: 550 µg/L day<sup>-1</sup> in *T. baccata* (Hirasuna et al. 1996) and 87 µg/L day<sup>-1</sup> in *T. wallichiana* (Navia-Osorio et al. 2002).

Fulfilling the aim of the work, we were able to optimize taxol production and enhance its excretion from the producer cells into the culture medium.

**Author contribution** This paper is part of the PhD dissertation of Nadia Tapia, who obtained the cell lines, studied the biomass changes, and prepared samples for HPLC. Alejandro Zamilpa performed HPLC analysis. Mercedes Bonfill and Alma Del Villar participated in the in vitro metabolomic study and gene expression analysis of *T. globosa*. Elsa Ventura and Francisco Cruz-Sosa coordinated the study and provided material and facilities for the experiments. Delia Cruz-Vega participated in the in vitro cytotoxic studies of the *T. globosa* extracts. Lidia Osuna provided the idea, and participated in the design and development of the research. All authors have read and approved the final manuscript.

**Acknowledgments** The authors thank Dr. Javier López Upton of the Colegio de Posgraduados-Chapingo for technical assistance in obtaining *T. globosa* plant material and Dr. Javier Palazón Barandela and Dra. Rosa Ma. Cusidó of the University of Barcelona for revising the manuscript. This research was supported by Fondo de Investigación en Salud (FIS) Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Grant FISAMSS/PROT/G12/1151. PAF received a doctoral fellowship from CONACYT, México (#248629). Work in the Plant Physiology Laboratory (University of Barcelona) was financially supported by the Spanish MEC (BIO2011-29856-CO2-01) and the Generalitat de Catalunya (2009SGR 1217).

## References

- Akaneme FI, Eneobong EE (2008) Tissue culture in *Pinus caribaea* Mor. var. *Hondurensis* Barr. and golf. II: effects of two auxins and two cytokinins on callus growth habits and subsequent organogenesis. *Afr J Biotechnol* 7:757–765
- Añas ZM, Angarita VM, Aguirre CAM, Restrepo FJM, Montoya VC (2009) Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Rev Fac Nal Agr Medellín* 62:4881–4895
- Barradas-Dermitz DM, Hayward-Jones PM, Mata-Rosas M, Palmeros-Sanchez B, Plas-Barradas OB, Velázquez-Toledo RF (2010) *Taxus globosa* S. cell lines: initiation, selection and characterization in terms of growth, and of baccatin III and paclitaxel production. *Biocell* 34:1–6
- Barrales CH, Soto HRM, Ramos VAC, Trejo TLI, Martínez VM, Ramírez GME, San Miguel CR, Luna PGR, López UJ (2011) Extracción y cuantificación de taxoides por HPLC en hojas in situ y en callos inducidos in vitro de *Taxus globosa* Schlecht. *Span J Rural Dev* 2:103–114
- Barrios H, Zhang YL, Sandoval C, Xiao ZA (2009) Increase of taxol production in *Taxus globosa* shoot callus by choline chloride. *Open Nat Prod J* 2:33–37

- Bonfil M, Cusidó RM, Palazón J, Piñol MT, Morales C (2002) Influence of auxins on organogenesis and ginsenoside production in *Panax ginseng* calluses. *Plant Cell Tiss Org Cult* 68:73–78
- Bonfil M, Exposito O, Moyano E, Cusidó RM, Palazón J, Piñol MT (2006) Manipulation by culture mixing and elicitation of paclitaxel and baccatin III production in *Taxus baccata* suspension cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:422–426
- Brown JT, Charlwood BV (1990) Organogenesis in callus culture. *Methods Mol Biol* 6:65–70
- Brunakova K, Babincovaz Z, Takac M, Cellarova E (2004) Selection of callus cultures of *Taxus baccata* L. as a potential source of paclitaxel production. *Eng Life Sci* 4:465–469
- Correa MY, Niño J, Mosquera MO (2006) Cuantificación de taxol y baccatina III en callos de *Taxus baccata* por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). *Scientia et Technica* 12(32):431–435
- Cusidó RM, Palazón J, Bonfil M, Navia-Osorio A, Morales C, Piñol MT (2002) Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus mafra*. *Biotechnol Prog* 18:418–423
- Duncan DR, Widholm JM (1990) Measurements of viability suitable for plant tissue cultures. *Methods Mol Biol* 6:29–37
- Exposito O, Sytkowska-Baranek K, Moyado E, Onrubia M, Bonfil M, Palazón J, Cusidó RM (2010) Metabolic responses of *Taxus mafra* transformed cell cultures to the addition of methyl jasmonate. *Biotechnol Prog* 26(4):1145–1153
- Furmanowa M, Glowniak K, Sytkowska-Baranek K, Zgórek G, Jóźefczyk A (1997) Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x mafra* var *Hatfieldii*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 49:75–79
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158
- Guerrero B, Castillo J, Aguilar MI, Delgado G (2000) 5 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 9 $\alpha$ , 10 $\beta$ , 13 $\alpha$ -penta acetoxy-4(20), 11 taxadiene-(7 $\beta$ -acetoxy-taxusin) and other constituents from the bark of the Mexican yew, *Taxus globosa* (Taxaceae). *J Mex Chem Soc* 44:148–150
- Hirasawa TJ, Pestchanker LJ, Srinivasan V, Shuler ML (1996) Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 44:95–102
- Ketchum REB, Gibson DM, Gallo LG (1995) Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of Pacific yew. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 42:185–193
- Khosroushahi AY, Naderi-Manesh H, Simonsen HT (2011) Effect of antioxidants and carbohydrates in callus cultures of *Taxus brevifolia*: evaluation of browning, callus growth, total phenolics and paclitaxel production. *BioImpacts* 1(1):37–45
- Kim CH, Kim KI, Chung IS (2000) Expression of modified green fluorescent protein in suspension culture of *Taxus cuspidata*. *J Microbiol Biotechnol* 10:91–94
- Lin HS, DeJue MJ, Jacobsen E (2000) The application of leaf explant micropropagation protocol in enhancing the multiplication efficiency of *Alstroemeria*. *Sci Hortic* 87:307–318
- Malik S, Cusidó RM, Mirjalili MH, Moyano E, Palazón J, Bonfil M (2011) Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process Biochem* 46:23–34
- McCown BH, Lloyd G (1981) Woody Plant Medium (WPM)—a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species. *Hortic Sci* 16:543
- Mihaljević S, Bjedov I, Kovac M, Lavanic DI, Jelaska S (2002) Effect of explant source and growth regulators on *in vitro* callus growth of *Taxus baccata* L. Washingtoni. *Food Technol Biotechnol* 40:299–303
- Moon WJ, Yoo BS, Kim DI, Byun SY (1998) Elicitation kinetics of taxane production in suspension cultures of *Taxus baccata* Pendula. *Biotechnol Tech* 12:79–81
- Navia-Osorio A, Garden H, Cusidó RM, Palazón J, Alfemann AW, Piñol MT (2002) Production of paclitaxel and baccatin III in a 20-L airlift bioreactor by a cell suspension of *Taxus wallichiana*. *Planta Med* 68:336–340
- Nims E, Dubois CP, Roberts SC, Walker EL (2006) Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metab Eng* 8:385–394
- Palazón J, Cusidó RM, Bonfil M, Morales C (2003) Inhibition of paclitaxel and baccatin III accumulation by mevinoлин and fosmidomycin in suspension cultures of *Taxus baccata*. *J Biotechnol* 101:57–63
- Richheimer SL, Tinnermeier DM, Timmons DW (1992) High-performance liquid chromatographic assay of taxol. *Anal Chem* 64:2323–2326
- Schiff PB, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* 277:665–667
- Soto-Hernández M, Sanjurjo M, González-Garra MT, Cruz-Vega D (2000) El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. *Ciencia Ergo Sum* 7(3):277–279
- Ströbel GA, Siede A, Hess WM (1993) Taxol formation in yew *Taxus*. *Plant Sci* 92:1–12
- Van Rosendaal ELM, Kurstjens SJJ, Van Beek TA (1999) Chemotaxonomy of *Taxus*. *Phytochemistry* 52:427–433
- Van Rosendaal ELM, Lelyveld GP, Van Beek TA (2000) Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related taxoids. *Phytochemistry* 53:383–389
- Vongpaseuth K, Roberts SC (2007) Advancements in the understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture. *Curr Pharm Biotechnol* 8:219–236
- Wang YD, Yuan YJ, Wu JC (2004) Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Biochem Eng J* 19:259–265
- Wickremesinhe ERM, Arcega RN (1993) *Taxus* callus cultures: initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 35:181–193
- Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y (1996) Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biotechnol* 14:1129–1132
- Zavala-Chávez F (2001) Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México. I Población de adultos y algunas características del hábitat. *Ciencia Ergo Sum* 8(2):169–174
- Zhang CH, Wu JY, He GY (2002) Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:396–402