



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la producción de paclitaxel en cultivos
celulares de *Taxus globosa* (Schltdl) elicitados con metil
jasmonato y ácido salicílico

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Sesangare Campos Quintana



DIRECTOR DE TESIS:

Ing. Teresa de Jesús Olivera Flores

2017

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de recibir una educación de la más alta calidad. Al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Conjunto E de Química, en donde se realizó el cultivo *in vitro* de *Taxus globosa*, así como al laboratorio de Fitoquímica del Depto de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias.

A mi asesora Ing. Teresa de Jesús Olivera Flores por compartir su gran experiencia en el cultivo de tejidos vegetales.

A la Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo del Depto. de Bioquímica del Conjunto E de Química por el apoyo con reactivos y material para la realización del presente estudio.

Agradezco de manera especial al M. en C. Roberto Enrique Llanos Romero por el tiempo dedicado a este trabajo y por el apoyo técnico en la identificación y cuantificación de paclitaxel.

Expreso mi gratitud también a la Dra. Josefina Herrera Santoyo por su cuidadosa revisión, su apoyo y enseñanza en el laboratorio.

A la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz por el apoyo brindado para la preparación de muestras previo al procedimiento fitoquímico y por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo.

Al M. en C. José Alfonso Vilchis Peluyera, por ser parte de mi jurado.

1. Datos del alumno

Campos
Quintana
Sesangare
56 66 18 92
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306050129

2. Datos del tutor

Ing.
Teresa de Jesús
Olivera
Flores

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Josefina
Herrera
Santoyo

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Roberto Enrique
Llanos
Romero

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Beatriz
Zúñiga
Ruiz

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
José Alfonso
Vilchis
Peluyera

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de la producción de paclitaxel en cultivos celulares de *Taxus globosa* (Schltdl) elicitados con metil jasmonato y ácido salicílico.

64 p.

2017

Índice

Abreviaturas.....	1
Índice de figuras.....	2
Resumen.....	4
Introducción.....	5
1. Antecedentes.....	7
1.1 <i>Taxus globosa</i> (Schltdl)	7
<i>Clasificación taxonómica y descripción botánica</i>	7
<i>Distribución geográfica y problemática ecológica</i>	8
<i>Usos e importancia farmacológica</i>	8
1.2 Cultivo de tejidos vegetales.....	9
<i>Tipos de cultivo</i>	12
<i>Evaluación de crecimiento celular en cultivos in vitro</i>	13
1.3 Metabolismo secundario.....	15
<i>Paclitaxel</i>	16
1.4 El CTV como una herramienta para la producción de metabolitos secundarios.....	17
1.5 Elicitación.....	18
<i>Metil jasmonato</i>	19
<i>Ácido salicílico</i>	19
1.6 Producción de paclitaxel en cultivos celulares de <i>Taxus</i>	19
2. Justificación.....	21
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos.....	22
<i>Objetivo general</i>	
<i>Objetivos particulares</i>	
5. Materiales y métodos.....	22
<i>Ruta experimental</i>	22
5.1. Etapa 1. Cultivo de tejidos vegetales.....	24
<i>Mantenimiento de cultivos celulares</i>	24
<i>Establecimiento de líneas celulares en suspensión</i>	25
<i>Evaluación de crecimiento celular</i>	25
<i>Elicitación con MeJa y AS</i>	25

5.2 Etapa 2. Fitoquímica.....	26
<i>Extracción</i>	26
<i>Cuantificación de paclitaxel por cromatografía en capa fina</i>	27
6. Resultados.....	28
6.1 Cultivo de tejidos vegetales.....	28
<i>Establecimiento de líneas celulares de T. globosa</i>	28
<i>Evaluación de crecimiento de cultivos en suspensión de T. globosa</i>	29
<i>Elicitación con metil jasmonato y ácido salicílico</i>	30
6.2 Fitoquímica.....	33
6.2.1 <i>Extracción</i>	33
<i>Rendimiento de extracto</i>	33
6.2.2 <i>Elicitación</i>	34
<i>Extractos de cultivos elicitados con metil jasmonato</i>	34
<i>Extractos de cultivos elicitados con ácido salicílico</i>	37
6.2.3 <i>Cuantificación de paclitaxel</i>	40
7. Discusión.....	48
<i>Establecimiento de líneas celulares de T. globosa</i>	48
<i>Evaluación de crecimiento de cultivos en suspensión de T. globosa</i>	49
<i>Elicitación con metil jasmonato y ácido salicílico</i>	49
<i>Rendimientos de extractos de células y medios nutritivos</i>	50
<i>Cromatografía en capa fina</i>	51
<i>Cuantificación de paclitaxel</i>	52
8. Conclusiones.....	55
9. Anexos.....	56
10. Referencias bibliográficas.....	58

Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
AgNO ₃	Nitrato de Plata
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
AS	Ácido salicílico
B5	Medio de cultivo Gamborg
BA	6-benciladenina
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés)
CHCl ₃	Cloroformo
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
Cin	Cinetina
ERO	Especie reactiva de oxígeno
MeJa	Metil Jasmonato
MeOH	Metanol
Pa	Paclitaxel
PVP	Polivinilpirrolidona
Pic	Picloram
Rf	Factor de retención
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
Tax	Medio sólido empleado para callos de <i>T. globosa</i>
Taxliq	Medio líquido empleado para células en suspensión de <i>T. globosa</i>

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación taxonómica de *T. globosa*.

Figura 2. Acículas de *T. globosa*. A) Haz de las hojas. B) Envés de las hojas y estróbilos masculinos. C) Semilla cubierta por arilo.

Figura 3. Fitohormonas y sus funciones.

Figura 4. Fases de la cinética de crecimiento celular.

Figura 5. Estructura química del paclitaxel.

Figura 6. Ruta experimental seguida para la extracción y cuantificación de paclitaxel en cultivos elicitados.

Figura 7. Curva de calibración de paclitaxel en CCF.

Figura 8. Callos de *T. globosa*. A) Callos de un año con alta oxidación B) Líneas celulares con baja oxidación y alta proliferación celular.

Figura 9. Cinética de crecimiento de células en suspensión de *T. globosa*.

Figura 10. Relación pf/ps de los tratamientos bajo elicitación.

Figura 11. Cultivos celulares de *T. globosa* a 10 días de elicitación con MeJa, A) Control, B) 50 μ M, C) 100 μ M, D) 150 μ M.

Figura 12. Cultivos celulares de *T. globosa* a 10 días de elicitación con AS, A) Control, B) 180 μ M, C) 360 μ M, D) 720 μ M.

Figura 13. Rendimiento de extractos de tratamientos elicitados con MeJa.

Figura 14. Rendimiento de extractos de tratamientos elicitados con AS.

Figura 15. CCF de extractos de AcOEt de células. Reactivo de Lieberman-Burchard. VIS.

Figura 16. CCF de extractos de AcOEt células (inicio) y medios nutritivos. Reactivo de Lieberman-Burchard. VIS.

Figura 17. CCF de extractos metanólicos de células. Reactivo de Lieberman-Burchard. VIS.

Figura 18. CCF de extractos metanólicos de células (inicio) y medios nutritivos. Reactivo de Lieberman-Burchard. VIS.

Figura 19. CCF de extractos de AcOEt de células. Reactivo de Lieberman-Burchard. VIS.

Figura 20. CCF de extractos de AcOEt. Células y medios nutritivos. Reactivo de Lieberman-Burchard. VIS.

Figura 21. CCF de extractos de AcOEt medios nutritivos (Med_360 y Med_720). Extractos metanólicos de células (Cel_ct). Reactivo de Lieberman-Burchard. VIS.

Figura 22. CCF de extractos metanólicos de células. Reactivo de Lieberman-Burchard. VIS.

Figura 23. CCF de extractos metanólicos de medio nutritivo. Reactivo de Lieberman-Burchard. VIS.

Figura 24 CCF de extractos metanólicos de medio nutritivo. Reactivo de Lieberman-Burchard. VIS.

Figura 25. Espectros de absorción de diferentes concentraciones de paclitaxel. UV (195-300 nm)

Figura 26. Espectros de absorción de bandas con Rf parecido a paclitaxel de extractos de células. Elicitación con MeJa. UV (195-300 nm).

Figura 27. Espectros de absorción de bandas con Rf parecido a paclitaxel de extractos de medios nutritivos. Elicitación con MeJa. UV (195-300 nm).

Figura 28. Espectros de absorción de bandas con Rf parecido a paclitaxel de extractos de células. Elicitación con AS. UV (195-300 nm).

Figura 29. Espectros de absorción de bandas con Rf parecido a paclitaxel de extractos de medios nutritivos. Elicitación con AS. UV (195-300 nm).

Figura 30. Concentración de paclitaxel en medio de nutritivo de cultivos elicitados con MeJa. Extractos de AcOEt.

Figura 31. Concentración de paclitaxel en los extractos de células y medios nutritivos de cultivos elicitados con AS.

Figura 32. Paclitaxel total por tratamiento de elicitación con AS.

Figura 33. Porcentaje de paclitaxel secretado en tratamientos con AS.

Figura 34. Producción de paclitaxel con el peso seco final en los tratamientos con MeJa.

Figura 35. Producción de paclitaxel con el peso seco final en los tratamientos con AS.

Figura 36. Paclitaxel total por tratamiento.

Resumen

El metabolismo secundario vegetal ha sido aprovechado por los seres humanos en muchos aspectos, uno de ellos es el uso en la industria farmacéutica, debido a que una gran cantidad de especies vegetales producen sustancias con actividad biológica. Es el caso del género *Taxus* y el paclitaxel, un diterpeno con actividad citotóxica empleado como parte de los tratamientos contra diferentes tipos de cáncer. Debido a la gran demanda del fármaco, comercialmente llamado Taxol®, y al bajo rendimiento de los árboles que lo producen, las poblaciones se han visto amenazadas; por lo anterior, el cultivo de tejidos vegetales se presenta como una alternativa para el aumento en la producción del metabolito, debido a la posibilidad de optimización de las condiciones de cultivo y aplicación de técnicas como la elicitación. El presente estudio tuvo por objetivo realizar la cuantificación de paclitaxel en cultivos celulares de *T. globosa* elicitados con metil jasmonato y ácido salicílico en diferentes concentraciones, para ello, se realizó una extracción selectiva de medios nutritivo y de células para posteriormente identificar por cromatografía en capa fina el metabolito y finalmente cuantificarlo por densitometría. Los resultados mostraron que el metil jasmonato da lugar a la secreción de una mayor cantidad de compuestos respecto a la elicitación con ácido salicílico. Por otro lado, al elicitar con ácido salicílico, se obtuvo mayor cantidad de paclitaxel, además de que se observó una menor oxidación en la suspensión celular.

Introducción

México, es uno de los países con mayor diversidad biológica en el mundo debido a su historia evolutiva, extensión, posición geográfica, diversidad de ecosistemas y presencia de litorales; según datos del año 2004 de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), en el mundo se cuenta con 272 655 especies de plantas vasculares y para México se estiman un 8.59 % de éstas (Villaseñor, 2004). La flora de México es de las más variadas y complejas del planeta (Llorente y Ocegueda, 2008) lo que aunado a la diversidad cultural de nuestro país, ha generado un aprovechamiento de las especies vegetales y con ello un vasto conocimiento de su uso, muchas de ellas empleadas en la medicina tradicional.

En muchos países en desarrollo, la sociedad satisface las necesidades de atención primaria de salud con el uso de tratamientos a base de plantas, que contienen sustancias empleadas para propósitos terapéuticos. En México, el 17 % de la riqueza vegetal se considera con alguna propiedad medicinal, sin embargo sólo el 5% ha sido validada química y farmacológicamente (Ocegueda, *et.al.*, 2005), tal es el caso del “tejo mexicano”, nombre común de una especie mexicana *Taxus globosa* de la familia Taxaceae. En España se han registrado usos tradicionales de otras especies del mismo género para la curación de padecimientos como las quemaduras y la incontinencia urinaria, sin embargo, el conocimiento tradicional también señala a esta planta como tóxica; dadas estas referencias, el estudio de extractos de *Taxus sp.* desembocó en el descubrimiento de propiedades anticancerosas y gracias al programa de búsqueda de sustancias antitumorales, desarrollado por el Instituto Nacional del Cáncer en EUA, se aisló el compuesto activo paclitaxel, comercialmente conocido como Taxol® (Zhong, 2002).

La producción de sustancias de importancia farmacológica como el paclitaxel, ocurre por el metabolismo secundario vegetal, el cual parte de moléculas provenientes del metabolismo primario y cuyos productos no están directamente implicadas en éste, dichos compuestos, llamados metabolitos secundarios o productos naturales son químicamente muy diversos y su distribución es restringida taxonómicamente, a diferencia de los metabolitos primarios, que se encuentran en todos los organismos del reino vegetal (Hartmann, 2007; Taiz y Zeiger, 2010).

En estudios recientes se sugiere el potencial del “tejo mexicano” para la obtención de paclitaxel a gran escala, sin embargo, dada su condición de especie protegida, es preciso utilizar alternativas que permitan su estudio sin la necesidad de depredarla; una de ellas es el cultivo de tejidos vegetales (CTV),

una herramienta biotecnológica que permite obtener cultivos de células sin extraer grandes cantidades de tejido de las plantas silvestres. Una de sus aplicaciones es el estudio de la producción de los metabolitos secundarios *in vitro*, sin poner en riesgo a los organismos en su hábitat natural, además pueden generarse líneas celulares y someterlas a tratamientos con el fin de aumentar la producción de los compuestos de interés mediante métodos como la biotransformación, la transformación genética y la elicitación. El último es un proceso muy empleado que consiste en adicionar al cultivo celular una sustancia con el fin de generar un estímulo, dando lugar a una respuesta bioquímica que aumenta la producción de metabolitos secundarios.

En este trabajo se ha empleado el CTV como una herramienta para la obtención de paclitaxel por medios alternativos, estableciendo líneas celulares de *T. globosa*, y comparando la producción de paclitaxel al elicitar con metil jasmonato y ácido salicílico.

1. Antecedentes

1.1 *Taxus globosa* (Schltdl)

Clasificación taxonómica y descripción botánica

La especie *Taxus globosa* fue descrita por Diederich von Schlechtendal en 1838 (López-Upton & García-Martí, 2015), su clasificación taxonómica se presenta en la fig. 1. Tiene una forma de vida arbórea (6 a 18 m de alto), con un tronco de diámetro no mayor a los 60 cm, es una planta dioica, perennifolia, muy ramificada. Tiene hojas distribuidas en espiral, aplanadas, lineares a linear-lanceoladas de 2 a 3.7 cm de largo y de 2 a 3 mm de ancho con una sola vena media engrosada, verde oscuro en el haz y más claras en el envés, con hileras de estomas en el envés (fig. 2, A y B).

Reino	PLANTAE
División	CONIFEROPHYTA
Clase	TAXOPSIDA
Orden	TAXALES
Familia	TAXACEAE
Género	<i>Taxus</i>
Especie	<i>Taxus globosa</i>

Figura 1. Clasificación taxonómica de *T. globosa*

En etapa reproductiva, los estróbilos masculinos son axilares ubicados en la parte inferior de las ramas (fig. 2, B), mientras que los estróbilos femeninos están ausentes pues los óvulos son solitarios, sésiles, ubicados en las axilas de las hojas, rodeados por varias brácteas membranosas. Las semillas son ovoides y sin ala, de color café, cubiertas parcialmente por un arilo carnoso de color rojo (fig. 2, C) (Luna, 2003).



Figura 2. Acículas de *T. globosa*. A) Haz de las hojas. B) Envés de las hojas y estróbilos masculinos. C) Semilla cubierta por arilo. Foto A y B: Earle, 2007. Tomada de http://www.conifers.org/ta/Taxus_globosa.php
Foto C. Tomado de <http://www.mexicanconifers.org/coniferales/taxaceae/taxus-globosa>

Distribución geográfica y problemática ecológica

En nuestro país, el “tejo mexicano” se encuentra en sitios con climas que van de templado subhúmedo a semicálido, en un intervalo de los 1000 a los 2950 msnm. Está asociado a bosque templado, bosque mesófilo de montaña, bosques de pino y encino (Luna, 2003). Es una especie incluida en una categoría de protección especial en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2010) y se considera como la especie con distribución geográfica más restringida en comparación con otras del mismo género (García, *et.al.*, 2012).

Se distribuye en los estados de Chiapas, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz (Contreras, *et. al.*, 2010); García y colaboradores (2012) reportan que las poblaciones con una alta densidad de individuos en Nuevo León y Tamaulipas son aquellas que se encuentran alejadas de asentamientos humanos y del impacto antropogénico causado por la tala y la ganadería, además mencionan que la distribución de algunas poblaciones abarca zonas aisladas con condiciones muy específicas de relieve, suelo y clima.

Usos e importancia farmacológica

La interacción de los seres humanos con las plantas ha ocurrido desde tiempos muy remotos, dando lugar a un conocimiento tradicional que es transmitido de generación en generación. Los usos tradicionales del *Taxus sp.* se han registrado principalmente en diferentes zonas de España en donde ha sido empleado para fabricar muebles y con fines medicinales por sus propiedades para aumentar el flujo sanguíneo, para tratar padecimientos odontológicos y para quemaduras, sin embargo, debido a su toxicidad no se recomienda para uso popular (Merino, 2004; Blanco, *et.al.*, 2008). Para la especie *T. globosa*, son escasos los reportes de su uso, sin ser mencionado el medicinal en México, respecto a la madera se refiere la fabricación de postes, cercas y pilares para sostener casas, además de la obtención de leña (García, *et.al.*, 2012).

Se requieren 3 000 árboles de *T. brevifolia*, especie de la cual se obtiene la mayor producción, para obtener 1 kg de paclitaxel, y la demanda en 2012 fue de 250 kg. Dado que especies como *T. baccata* y *T. brevifolia* también son explotadas para la producción de paclitaxel, se ha realizado un gran esfuerzo

con la finalidad de obtener este metabolito en condiciones que no pongan en riesgo a las especies en su hábitat natural (Nomila, *et.al.*, 2012; Xiong, *et. al.*, 2013).

Taxus globosa, ha sido poco estudiado y se reporta junto con *T. floridana* como una de las especies con mayor producción de paclitaxel (400-500 µg/g de peso seco de acículas), sin embargo se requieren 100 años para que la planta alcance una talla adecuada para su explotación (diámetro de 25 cm y 6-9 m de altura) (Barradas *et.al.*,2010; Soto *et.al.*, 2011)

Como se mencionó con anterioridad, el paclitaxel posee efecto antineoplásico, su mecanismo de acción es por medio de la estabilización de los microtúbulos, impidiendo la división de las células cancerosas (Schiff, *et.al.*, 1979). Aunque su indicación principal es para cáncer de mama, ovario, pulmón, colon, próstata e hígado también es empleado para tratar padecimientos como el sarcoma de Kaposi, la malaria y la artritis reumatoide (Croom, 1995; Brown, 2003;Mc Guire, *et.al.*, 1989; Senthilkumar, *et. al.*, 2013; Wang, *et.al.*, 2013).

1.2 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta que permite estudiar procesos fisiológicos y bioquímicos de las células vegetales en condiciones asépticas y controladas con el fin de realizar estudios de investigación básica, sin embargo, también puede ser aprovechada para la obtención masiva de plantas libres de patógenos, generación de plantas transformadas genéticamente, producción de metabolitos secundarios, entre otros (Evans, *et. al.*, 2003).

Pueden usarse diferentes tejidos de la planta (explantes) para la obtención de células, pues las técnicas empleadas se basan en la totipotencialidad celular teoría propuesta por Haberlandt en 1902, la cual menciona la capacidad de las células para desdiferenciarse y recuperar su condición meristemática. Posteriormente, pueden rediferenciarse en cualquier tipo celular para dar lugar nuevamente a un tejido y finalmente a una planta completa (George, 2008).

La elección del explante es de suma importancia; para hacerlo adecuadamente se deben tomar en cuenta diferentes factores como: el tipo de cultivo requerido, las características de la planta donadora, características del tejido u órgano y que el tejido se encuentre libre de microorganismos ya que se establecerá en condiciones asépticas (George, 2008).

Las técnicas de CTV permiten que el desarrollo celular sea de manera organizada o desorganizada. En el primer caso, la proliferación celular dará lugar a órganos definidos, como nodos, primordios de hoja, embriones, etc. Dichos órganos pueden ser individualizados y transferidos a un medio fresco donde seguirán su desarrollo. Por otro lado, cuando a partir del explante se forman agregados celulares con crecimiento desorganizado se obtiene un callo, el cual se puede mantener en medios sólidos, semisólidos o líquidos durante largos periodos de tiempo (George, 2008).

La subsistencia, desarrollo y respuesta de las células de interés, depende en gran medida del material genético expresado, así como de las condiciones ambientales y del medio nutritivo en el que se encuentran. Respecto a éste último, generalmente contiene sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, aminoácidos, alguna fuente de carbono, en casos especiales antioxidantes y puede o no incorporar un agente gelificante. Una vez mezclados los componentes del medio, es necesario ajustar el pH en un intervalo de 5 a 6 ya que en esta condición los nutrientes se encuentran disponibles para las células (George, 2008).

Sales inorgánicas

De acuerdo con Evans y colaboradores (2003), elementos como nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio y azufre son requeridos por las plantas en concentraciones milimolares, cantidad considerada elevada y por ello son llamados macronutrientes. Estos elementos son usados por la célula principalmente para la síntesis de las macromoléculas (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos). Por otro lado, los micronutrientes, se requieren en concentraciones micromolares y son el hierro, níquel, cloro, manganeso, zinc, boro, cobre y molibdeno, estos elementos son de gran importancia para la célula pues forman parte de las coenzimas. Tanto micro como macronutrientes son imprescindibles para el metabolismo primario de las células y en consecuencia para su supervivencia.

Compuestos orgánicos

Para tener un adecuado crecimiento de las células *in vitro*, el medio de cultivo debe suplementarse con compuestos orgánicos como vitaminas y aminoácidos. Las vitaminas, funcionan como coenzimas para que se lleven a cabo adecuadamente las funciones del metabolismo, mientras que los aminoácidos son una fuente de nitrógeno en su forma reducida (Bhojwani, 2013). También es imprescindible contar con una fuente de carbono, generalmente sacarosa con el fin de reemplazar el carbono que la planta fija por medio de la fotosíntesis (George, 2008).

Reguladores de crecimiento

En los órganos vegetales, se producen de manera natural sustancias químicas orgánicas requeridas en cantidades mínimas para llevar a cabo su función, regular procesos relacionados principalmente con la diferenciación celular y el desarrollo de la planta. A estas sustancias las conocemos como hormonas vegetales o fitohormonas y se pueden dividir en cinco clases: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (fig. 3) (George, 2008; Evans, *et al.*, 2003 y Davies, 2010). En cambio, los reguladores de crecimiento o fitorreguladores son sustancias químicas sintéticas con actividad similar a las hormonas vegetales o la capacidad de modificar el desarrollo de planta, dichos reguladores son los que generalmente se emplean en el CTV.

Regulador de crecimiento	Precursor	Sitio de biosíntesis	Función
Auxinas	Triptofano	Meristemos	Elongación celular División celular Diferenciación del tejido vascular Diferenciación y desarrollo de raíces Dominancia apical Tropismo Retrasa la senescencia de hojas Desarrollo de las partes florales
Citocininas	Adenina	Raíces	División celular (en conjunto con auxinas) Promueve la formación de brotes Desarrollo de cloroplastos Promueve la expansión de hojas
Giberelinas	Gliceraldehído-3-fosfato	Tejidos jóvenes de brotes y semillas en desarrollo	Desarrollo de tallos Inducción de germinación de semillas Producción de enzimas durante la germinación Desarrollo de frutos
Ácido abscísico	Gliceraldehído-3-fosfato	Raíces y hojas maduras	Cierre estomático Inhibe el crecimiento de raíces Induce el almacenamiento de proteínas en semillas Afecta la dormancia de semillas
Etileno	Metionina	Cualquier tejido como respuesta a estrés	Estimula respuestas de defensa Formación de raíces adventicias Senescencia de hojas y flores Inducción de floración en algunas plantas Apertura de flores Maduración de frutos

Figura 3. Fitohormonas y sus funciones (Davies, 2010)

Agente gelificante

Los medios de cultivo pueden ser sólidos, semi-sólidos o líquidos dependiendo del tipo de cultivo celular que se establezca. A los medios sólidos debe adicionarse un agente gelificante que tenga las características de ser inerte y esterilizable en autoclave. El medio sólido funge como un soporte para el cultivo.

Tipos de cultivo

En el CTV, se pueden establecer diferentes tipos de cultivo celular según el explante que se utilice:

a) cultivo de órganos, b) cultivo de callo, c) cultivo de células en suspensión, d) cultivo de protoplastos, e) cultivo de polen y óvulos.

a) Cultivo de órganos. Es un cultivo con un crecimiento organizado, en el cual las células del explante tienen una predeterminación a la diferenciación. Puede realizarse a partir de órganos definidos (hojas, tallos, raíces, etc.) o de zonas meristemáticas (meristemas apicales o de raíces) (George, 2008). Este tipo de cultivos son empleados para la vía morfogénica de la organogénesis directa.

b) Cultivo de callo. Son cultivos en los que a partir de un segmento de la planta (hojas, tallos, raíces, etc) se induce a la formación de una masa con crecimiento desorganizado, llamada callo, formada por células no diferenciadas en un medio sólido enriquecido generalmente con auxinas para inducir la división celular, que también depende del nivel de hormonas endógenas del explante. El callo comienza a crecer en las zonas en donde se realizó el corte del explante y se extiende progresivamente hasta cubrirlo todo; el cultivo se puede mantener por un tiempo indeterminado subcultivando periódicamente y si así se desea puede inducirse la diferenciación celular para dar lugar a órganos (organogénesis indirecta) cambiando los reguladores de crecimiento en el medio, (Bhojwani, 2013).

c) Cultivo de células en suspensión. Una vez establecido un cultivo de callo, éste se puede transferir a un medio líquido para obtener suspensiones celulares. En este caso las células están en mayor contacto con el medio nutritivo pues se encuentra en estado líquido y en agitación constante, lo anterior beneficia el crecimiento celular y la formación de agregados celulares muy pequeños e incluso el mantenimiento de células individuales. Las células están poco diferenciadas y presentan paredes celulares muy delgadas además de una gran variación en formas y tamaños. Dentro de la suspensión

celular, las células que se encuentran en agregados celulares grandes, poseen estructuras un poco más diferenciadas como las paredes celulares, que son más gruesas (George, 2008).

d) Cultivo de protoplastos. Es el cultivo de células vegetales desprovistas de pared celular.

e) Cultivo de polen y óvulos. Este tipo de cultivo tiene por objetivo obtener plantas haploides.

En el presente estudio se empleó el cultivo de callo para establecer posteriormente células en suspensión, tipo de cultivo seleccionado debido a su mayor proliferación celular, mayor homogeneidad y que al agregar el elicitador, todas las células estarán en contacto con éste.

Evaluación de crecimiento celular en cultivos in vitro

Un parámetro fundamental para la caracterización de los cultivos celulares es el crecimiento celular, de gran importancia para establecer los tiempos de subcultivo, de transformación genética y, como es el caso de este trabajo, establecer el tiempo adecuado para la elicitación.

Existen diversas formas de evaluar el crecimiento en cultivos celulares en suspensión como son el conteo celular, el volumen de paquete celular, el peso fresco y peso seco. Para el presente estudio, se determinó el peso fresco y seco. Para el primero, se debe tomar una alícuota de la suspensión celular para filtrarla con ayuda de un papel previamente pesado, las células se enjuagan para retirar el medio nutritivo y se drena al vacío para eliminar la mayor cantidad de agua extracelular. Finalmente, se obtiene el resultado por diferencia de peso. En el caso de la determinación del peso seco, se realiza el mismo procedimiento de filtración que se usa para obtener el peso fresco y al final se seca la muestra de células durante 12 horas a 60°C o si es necesario, durante más tiempo hasta que el peso de la muestra sea constante.

Al graficar los datos obtenidos por cualquiera de los métodos antes mencionados respecto al tiempo, se puede obtener una curva de crecimiento que presenta diferentes etapas:

I) Fase lag: Se observa en los primeros días de establecido el cultivo celular. En esta etapa las células se adaptan al medio de cultivo y comienzan a procesar los nutrientes que encuentran en él, tienen un metabolismo activo, sin embargo no comienzan a duplicarse.

II) Fase exponencial: Las células comienzan a reproducirse, lo cual se refleja en un crecimiento exponencial, sin embargo, este crecimiento agotará los nutrientes del medio de cultivo.

III) Fase estacionaria: Debido a la reproducción celular, los nutrientes del medio comienzan a agotarse y por ende, las células dejan de reproducirse, manteniéndose constante la cantidad de células en el cultivo.

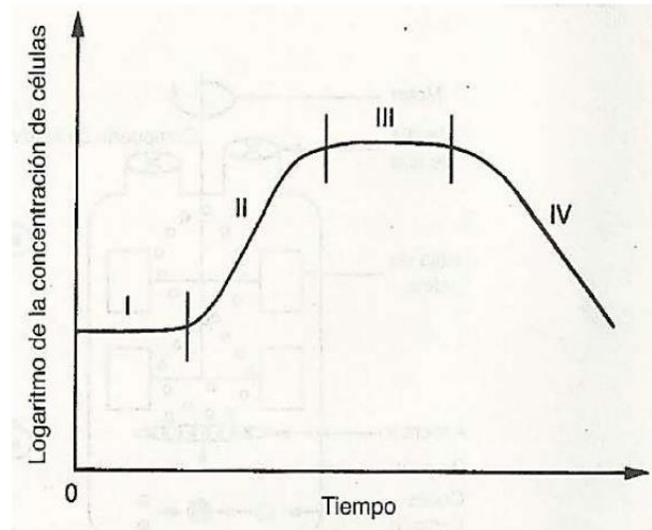


Figura 4. Fases de la cinética de crecimiento celular

IV) Fase de muerte celular: Finalmente, la falta de nutrientes en determinado tiempo, da lugar a la muerte celular, observándose un decremento en la cantidad de células.

En la última fase de la cinética de crecimiento, al agotarse los nutrientes, las células se encuentran en una condición de estrés, que se refleja en una disminución del peso fresco y seco. Ante esta alteración en la homeostasis metabólica, las plantas activan un proceso de aclimatación para ajustar su estado metabólico nuevamente activando una red de vías de transducción de señales que darán lugar a la formación de proteínas para restaurar nuevamente el equilibrio, moléculas señalizadoras derivadas de la degradación de membrana, especies reactivas de oxígeno (ERO), así como compuestos osmoprotectores y antioxidantes (Mittler, 2002; Mittler, *et. al.*, 2004).

Para determinar algunas características del crecimiento de la biomasa, también se pueden calcular algunos parámetros como el índice de crecimiento, la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación (Arias, 2009).

Índice de crecimiento (IC). Se obtiene con la relación del peso de la biomasa en la fase exponencial entre el peso inicial.

$$IC = \frac{X - X_0}{X_0}$$

Velocidad específica de crecimiento. En donde se relaciona la cantidad de biomasa en el tiempo que dura la fase exponencial, se expresa en g/ día

$$\mu = \frac{\ln X/X_0}{t - t_0}$$

Tiempo de duplicación celular. Tiempo en el que la biomasa se duplica, se expresa en días.

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

En donde:

μ = velocidad específica de crecimiento

X = Biomasa final

X_0 = Biomasa inicial

t = Tiempo en el que finaliza la fase exponencial

t_0 = Tiempo en el que inicial la fase exponencial

1.3 Metabolismo secundario

En las células vegetales, el conjunto de reacciones químicas que ocurren para la supervivencia y producción de nuevas células es conocido como metabolismo primario e implica procesos básicos como la fotosíntesis, respiración, crecimiento y desarrollo de la planta. Por otra parte, el metabolismo secundario es definido como el conjunto de reacciones químicas que dan lugar a sustancias llamadas metabolitos secundarios, compuestos de bajo peso molecular formados a partir de moléculas producidas en el metabolismo primario. La producción de metabolitos secundarios en la naturaleza es muy baja debido a que depende en gran medida del estado fisiológico y de desarrollo de la planta, además de que acumulan de manera diferencial en raíces, tallos y hojas (Tang, *et.al.*, 2010).

Los metabolitos secundarios no son indispensables para el crecimiento y desarrollo de las células, pero sí favorecen su interacción con el medio; se sugiere esta relación ya que las plantas producen proteínas que inducen a un sistema de defensa química por medio de los metabolitos secundarios para

protegerse de microorganismos y herbívoros (Gundlach, *et al.*, 1992; Hartmann, 2007; Taiz y Zeiger, 2010). Las plantas tienen diferentes mecanismos químicos de defensa: 1) la acumulación de compuestos de defensa que se almacenan en una zona determinada, 2) la producción de precursores de los compuestos de defensa, así como de las enzimas que modificarán a dichos precursores y 3) la formación de moléculas de defensa como respuesta al ataque de patógenos y/o herbívoros (Hartmann, 2007).

Los diferentes mecanismos químicos desencadenados para una defensa por parte de la planta, son inducidos porque ésta se encuentra en un estado de estrés, que está definido como una condición desfavorable que afecta el metabolismo, crecimiento y desarrollo de la planta, induciendo una respuesta para su sobrevivencia (Lichtenthaler, 1998; Gaspar, *et al.*, 2002; Kranner, 2010).

Paclitaxel

El paclitaxel, comercialmente llamado Taxol, es un diterpeno polioxigenado que se sintetiza a partir del isopentil difosfato. Se forma por un anillo de taxano y una cadena lateral derivada de fenilalanina (Cusidó, *et al.*, 2007), fue aislado por primera vez en 1969 de la corteza de *T. brevifolia* y su estructura química se elucidó en 1971 por Wani y colaboradores (Fig. 5).

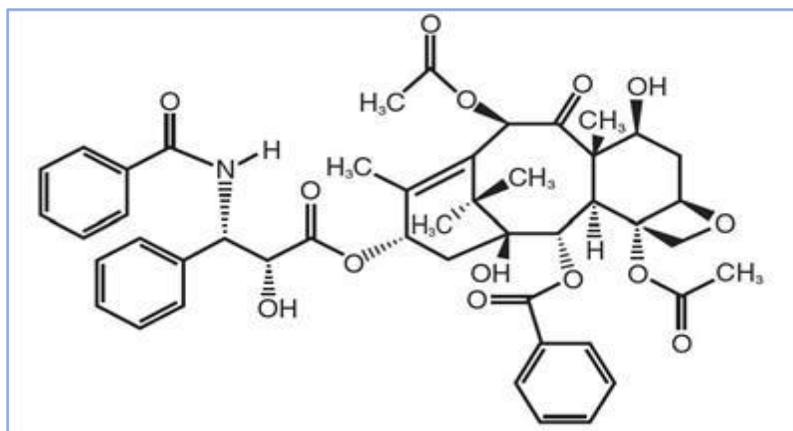


Figura 5. Estructura química del paclitaxel.

El paclitaxel es una sustancia aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) desde 1992 para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, entre ellos el de mama, ovario, pulmón, así como el sarcoma de Kaposi. Su mecanismo de acción es por medio de la estabilización de los microtúbulos de las células,

inhibiendo su división (Neumann, 2009). Una limitante es que en condiciones naturales se encuentra en bajas concentraciones y la producción es muy variable entre especies (Van Rozendaal, *et. al.*, 2000).

1.4 El CTV como una herramienta para la producción de metabolitos secundarios

Una gran cantidad de metabolitos secundarios hoy en día tienen importancia económica pues son empleados como fragancias, colorantes, saborizantes, insecticidas, fármacos, etc., sin embargo, un factor limitante es su baja producción en condiciones naturales y la extracción directa de la planta traería como consecuencia la destrucción del hábitat; por otro lado, la síntesis química no siempre resulta viable dada la complejidad estructural de los compuestos de interés; por ello, se ha hecho uso del cultivo de tejidos vegetales como una herramienta para favorecer la producción de metabolitos secundarios (Bhojwani y Dantu, 2013).

El CTV permite establecer un cultivo celular en el que se pueden seleccionar características deseables para la obtención de líneas celulares y cultivos homogéneos en condiciones controladas, por lo que disminuyen los factores que pueden alterar la producción de metabolitos como la estacionalidad, el clima o algunas enfermedades. También, con ayuda de esta herramienta, disminuye el riesgo de extinción de las especies en la naturaleza (Bhojwani y Dantu, 2013).

Algunas de las técnicas para la producción de metabolitos secundarios *in vitro* son la biotransformación, inmovilización de células, la producción heteróloga, el cultivo de raíces y la elicitación. En el primer caso, se adiciona un precursor que puede ser natural o sintético y las células al integrarlo como parte de su metabolismo, producen el compuesto de interés. Para la inmovilización de células se requiere un polímero en el que se encapsulan los agregados celulares, simulando la organización celular del tejido, por lo que se presenta una diferenciación bioquímica, favoreciendo la síntesis de productos naturales (Neumann, 2009). La producción heteróloga, implica introducir mediante la transformación genética la ruta metabólica del compuesto de interés en un organismo de rápido crecimiento como las bacterias (Wilson y Roberts, 2012) y el cultivo de raíces se ha empleado ya que éstos órganos tienen la capacidad de acumular una gran cantidad de compuestos secundarios (Srivastava, 2007). La elicitación consiste en la adición de una sustancia (elicitor) al cultivo celular, generando una respuesta de estrés.

1.5 Elicitación

Cuando una planta es atacada por microorganismos o herbívoros, presenta mecanismos de defensa que pueden ser constitutivos o inducibles. Los primeros proveen a la planta una defensa pasiva ya sea por la estructura de la planta o la acumulación de compuestos tóxicos dentro de las células, sin implicar la presencia del patógeno, mientras que la defensa inducida es un mecanismo que se activa como respuesta al ataque de un patógeno, dando lugar a la producción de proteínas, muchas de ellas involucradas en la formación de callos, reforzamiento de paredes celulares, biosíntesis de enzimas antimicrobianas y de fitoalexinas que en su mayoría son terpenos e isoflavonoides (Brooks y Watson, 1991; Madriz, 2002). Éste tipo de respuestas, son fáciles de simular en condiciones *in vitro*, por ello es una de las técnicas más empleadas para la producción de metabolitos secundarios, la cual consiste en, adicionar una sustancia, llamada elicitor, que desencadena en las células una respuesta al estrés. El elicitor es capaz de inducir un cambio en la respuesta fisiológica y morfológica así como la acumulación de ciertas sustancias en las células vegetales, principalmente fitoalexinas, sin embargo, es empleado comúnmente para cualquier compuesto producido en condiciones de resistencia a patógenos (Zhao, *et al.* 2005; Angelova, *et al.*, 2006).

Los elicitores pueden ser clasificados por su origen en bióticos, como hongos, bacterias, virus, componentes de paredes celulares o sustancias químicas relacionadas con la defensa de la planta ante un herbívoro o patógeno (glicoproteínas, polímeros de glúcidos, ácidos orgánicos de bajo peso molecular) y por otro lado los elicitores abióticos son la luz UV, sales de metales pesados, así como los compuestos inorgánicos (DiCosmo y Misawa, 1985; Zhao, *et al.* 2005).

Cuando se agrega el elicitor, se pueden inducir varias respuestas de defensa como la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la respuesta hipersensible, así como la producción de fitoalexinas (Angelova, *et al.*, 2006).

Metil jasmonato

Los jasmonatos son un grupo de compuestos derivados del ácido linoleico y están relacionado con la defensa en las células vegetales. El ácido jasmónico es considerado una fitohormona que juega un importante papel en el desarrollo de las antera y del polen (Taiz y Zeiger, 2010). El metil jasmonato

(MeJa) deriva del ácido jasmónico y es parte de las señales de transducción en los mecanismos de defensa de las plantas, aumentando su concentración endógena en plantas sometidas a estrés. Los genes que codifican para la biosíntesis de los jasmonatos son inducibles y éstos, a su vez inducen la formación de proteínas relacionadas con la patogénesis (Chávez, *et. al.*, 2012).

Ácido salicílico

Un mecanismo de defensa por parte de las plantas es la síntesis de ácido salicílico, un regulador endógeno de crecimiento que participa en la inhibición del etileno también suprime enzimas que destoxifican a la célula de las especies reactivas de oxígeno (ERO), producidas bajo alguna condición de estrés (Klessing, *et. al.*, 2000). En consecuencia hay una presencia excesiva de ERO, lo que da lugar a la activación de otros genes para formar compuestos antioxidantes, entre ellos el ascorbato, glutatión, tocoferol, flavonoides, alcaloides y carotenoides (Halliwell, 2006). Por esta razón el AS es empleado para desencadenar la producción de metabolitos secundarios en condiciones *in vitro*.

1.6 Producción de paclitaxel en cultivos celulares de *Taxus* sp.

En diferentes estudios se reporta la producción de taxanos en cultivos *in vitro* de diferentes especies del género *Taxus* (tabla 1). Una alternativa para el aumento de la producción de metabolitos como el paclitaxel. Las especies más explotadas y estudiadas con la finalidad de obtener mayor concentración de taxanos son *T. baccata*, *T. brevifolia* y *T. cuspidata*, siendo *T. globosa* es una especie poco contemplada en este ámbito. En años recientes se han publicado trabajos que presentan los resultados de elicitaciones con diversas sustancias como metil jasmonato, ácido salicílico, extractos fúngicos, tiosulfato de plata, quitosano, etanol, peróxido de hidrógeno, entre otros; los elicitors más empleados en cultivos del género *Taxus* son el metil jasmonato y el ácido salicílico.

Respecto a la localización de paclitaxel en células o en medio nutritivo, inicialmente se reportó la presencia del metabolito únicamente en células, pero estudios más recientes lo han encontrado tanto en ellas como en el medio nutritivo, no obstante es mayor la cantidad del paclitaxel intracelular que extracelular (Khosroushahi, *et. al.*, 2006). Lo anterior, podría dificultar la producción de paclitaxel *in vitro*, pues para obtenerlo es necesario lisar las células y con ello perder biomasa potencial para la subsecuente producción del metabolito. Se reporta que el paclitaxel no se encuentra almacenado en

las vacuolas, sino en la pared celular, lo cual puede favorecer la extracción del metabolito sin afectar la biomasa (Choi,H., *et. al.*, 2001).

Tabla 1. Producción de taxanos en diferentes especies del género *Taxus*. (*Cultivos celulares sin elicitación)

Especie	Producción de taxanos	Referencia
<i>Taxus baccata</i>	Paclitaxel: 39.75 mg/L	Khosroushahi, <i>et. al.</i> , 2006
	Paclitaxel: 20.05 mg/L	Bonfil, <i>et.al.</i> , 2006
	Paclitaxel: 32.9 mg/L	Rezaei, <i>et.al.</i> , 2011
	Baccatina III: 1.3 mg/L Paclitaxel: 2.47 mg/L Baccatina III extracelular: 1.3 mg/L Paclitaxel extracelular 1.32 mg/L	Amini, <i>et. al.</i> , 2014
<i>Taxus canadensis</i>	Paclitaxel: 40.2 mg/L	Roberts, <i>et. al.</i> , 2003
<i>Taxus chinensis</i>	Paclitaxel: 125 mg/L	Zhang, 2000
	Taxuyunanina C: 527 mg/L	Zhong J. 2002
	Bacatina III: 14 mg/L	Yuan, <i>et.al.</i> , 2002
	Paclitaxel: 12 mg/L	Wu y Lin, 2003
<i>Taxus cuspidata</i>	*Paclitaxel 14.78 mg/L	Ketchum, <i>et. al.</i> , 1996
<i>Taxus globosa</i>	*Paclitaxel en callo: 0.02 % de extracto en peso seco. *Bacatina III: 0.043 % de extracto en peso seco.	Fett-Neto, <i>et. al.</i> ,1994
	Paclitaxel: 86 µg Baccatina III : 1 µg 10-diacetil baccatina III: 4 µg 10-diacetiltaxol: 21 µg Cefalomanina: 27 µg	Benítez, 2009
	10-diacetil baccatina III: 2156 µg/g Cefalomanina: 541 µg/g Paclitaxel: 115.15 µg/g	Barrales y Ramírez, 2013

2. Justificación

La alta incidencia de enfermedades como el cáncer ha traído como consecuencia el aumento en el uso de medicamentos como el paclitaxel, producido por una gimnosperma del género *Taxus sp.* El aumento en la demanda da lugar a una extracción masiva del metabolito en la corteza y follaje de árboles de este género, poniendo en riesgo su presencia en el hábitat natural.

La obtención del medicamento por síntesis química representa un alto costo, la serie de reacciones químicas es muy larga y se obtienen muy bajos rendimientos, por otro lado, la semisíntesis requiere de precursores del paclitaxel, que para extraerlos es necesaria la planta.

Por lo anterior, la elicitación de cultivos celulares *in vitro* representa una alternativa para optimizar la producción de metabolitos secundarios como el paclitaxel e incluso sus precursores para llevar a cabo la semisíntesis sin utilizar grandes cantidades de biomasa silvestre.

3. Hipótesis

La elicitación de líneas celulares de *T. globosa* con metil jasmonato y ácido salicílico a diferentes concentraciones, tendrá un efecto sobre la producción de paclitaxel, siendo mayor en aquellos tratamientos con una alta concentración de elicitor.

4. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la producción de paclitaxel en líneas celulares de *T. globosa* utilizando diferentes concentraciones de metil jasmonato y ácido salicílico

Objetivos particulares

- Obtener líneas celulares de *T. globosa* con baja oxidación y alta proliferación celular
- Evaluar la proliferación celular en cultivos en suspensión.
- Buscar la relación entre elicitador y concentración del mismo con la producción de paclitaxel en cultivos celulares.
- Seleccionar el mejor disolvente para realizar la extracción de paclitaxel en cultivos celulares de *T. globosa*
- Cuantificar el contenido de paclitaxel en extractos de células y medios de cultivo de *T. globosa* sometidos a las diferentes concentraciones de MeJa y AS.

5. Materiales y métodos

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Química, UNAM; así como en el laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Ruta experimental

El trabajo se dividió en dos etapas (fig. 6), la primera correspondió al establecimiento y proliferación de los cultivos celulares así como su elicitación y la segunda etapa fue el análisis fitoquímico de los cultivos elicitados.

Los cultivos celulares fueron obtenidos a partir de tallos jóvenes de ejemplares de la especie *T. globosa* donados por el INIFAP. La inducción y proliferación de los callos fue realizada por el Biól. Diego Padilla y el Biól. Josué Barrera. El mantenimiento del callo se llevó a cabo durante seis años antes de realizar los experimentos que se reportan en el presente trabajo.

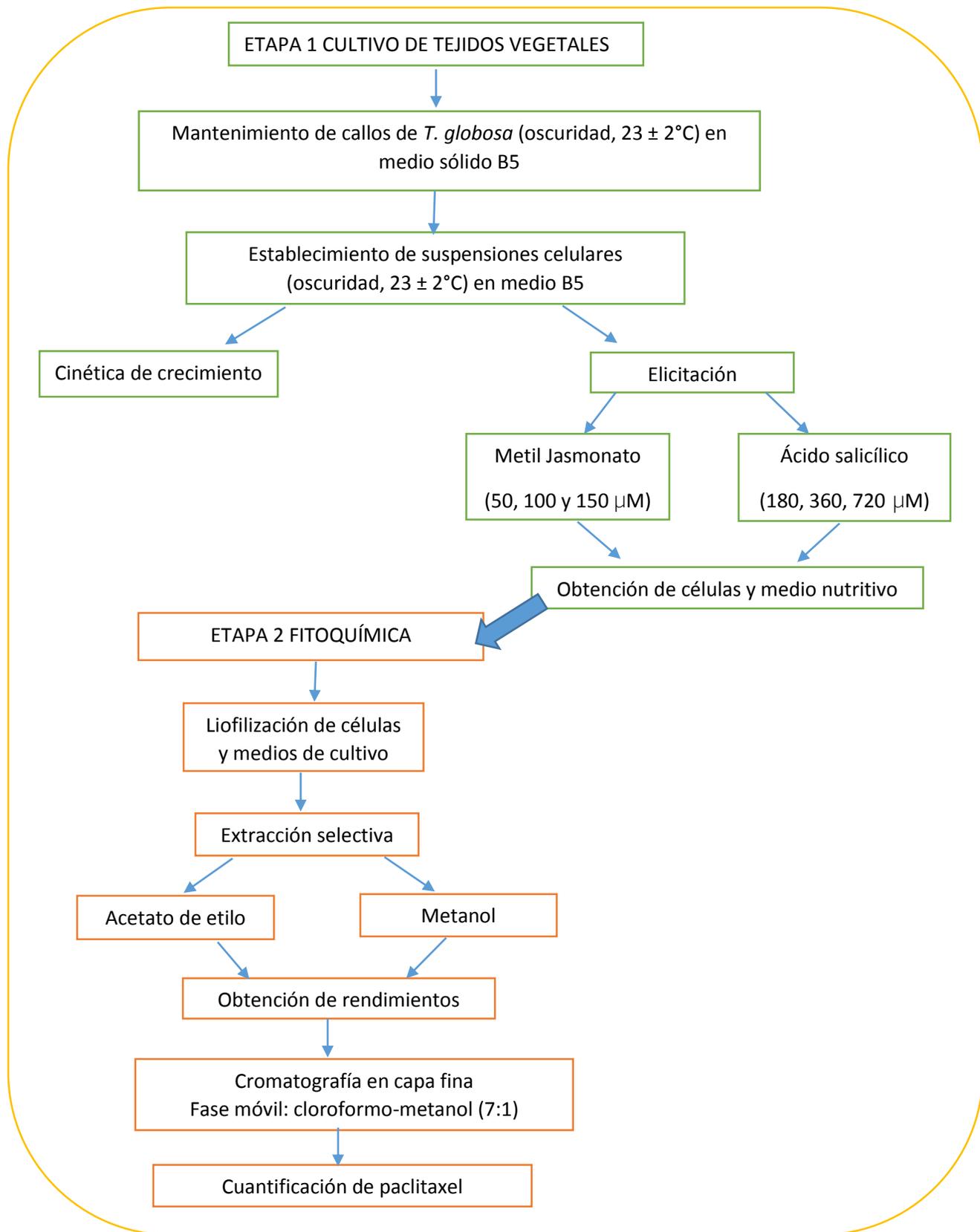


Figura 6. Ruta experimental seguida para la extracción y cuantificación de paclitaxel en cultivos elicitados

ETAPA 1

5.1 Cultivo de Tejidos Vegetales

Mantenimiento de cultivos celulares

Para el mantenimiento de los cultivos celulares, se usaron medios de cultivo sólidos para callo y líquidos para suspensiones celulares. Se prepararon a partir de soluciones concentradas de sales B5 (anexo 1) y suplementadas con vitaminas, sacarosa, antioxidantes, reguladores de crecimiento y aminoácidos (tabla 2). Todos los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.7. Los medios se esterilizaron en una autoclave vertical a una presión de 1.2 kg.cm² y a una temperatura de 120°C durante 18 min.

Tabla 2. Componentes de los medios de cultivo Tax y Taxliq para *T. globosa*.

Componente	Concentración (medio sólido Tax)	Concentración (medio líquido Taxliq)
Sales B5	100%	
Vit. Kao		
Vit. Nitsch		
Ácido aspártico	0.1275 g	
Arginina	0.175 g	
Glicina	0.07 g	
Prolina	0.112 g	
PVP	1 g	
Picloram	10 mg	---
ANA	---	25 mg
AIA	---	25 mg
AIB	---	25 mg
Kinetina	1.1 mg	---
BA	---	1 mg
Gelzan	3.3 g	----
AgNO ₃	2 mg	
Sacarosa	3 %	
pH	5.7	

Los callos obtenidos de la inducción realizada en el año 2010, se mantuvieron en condiciones de oscuridad a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, se realizaron subcultivos cada cuatro semanas en el medio *Tax* (tabla 2) sin manipular excesivamente el material biológico.

Establecimiento de líneas celulares en suspensión

Los callos se seleccionaron cualitativamente tomándose en cuenta características como: ser disgregables, tener baja oxidación y alta proliferación celular. Los callos seleccionados, se emplearon para establecer 10 cultivos madre agregando 12 g de callo en 60 ml de medio nutritivo *Taxliq* (tabla 2) en matraces de 250 ml. Todos los matraces se incubaron bajo condiciones de oscuridad a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación constante a 100 rpm. Después de una semana, las suspensiones fueron filtradas con ayuda de una gasa estéril para obtener cultivos con agregados celulares homogéneos, se retiró la mitad del medio nutritivo viejo para agregar ese mismo volumen de medio fresco y se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm.

Evaluación de crecimiento celular

Se tomaron en cuenta diferentes parámetros para evaluar el crecimiento celular de las suspensiones. Para determinar las diferentes etapas del crecimiento de los cultivos celulares, después de dos semanas, las suspensiones se homogeneizaron y separaron en 10 matraces de 50 ml con 23 ml de suspensión celular cada uno, posteriormente se realizó una curva de crecimiento en la que se muestra peso fresco y seco de alícuotas que se tomaron a lo largo de 15 días. El tiempo cero se tomó colocando 1 ml de suspensión en tubos de microcentrífuga previamente pesados, se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante y por diferencia se determinó el peso fresco de cada muestra. Los tubos se mantuvieron abiertos para que el contenido se secase por completo y después de 5 días se registró el peso seco. Cada tercer día se realizó el mismo procedimiento y los resultados se expresaron graficando peso vs tiempo de cultivo. Otros parámetros para caracterizar el crecimiento de los cultivos fueron el índice de crecimiento (IC), la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (td).

Elicitación con MeJa y AS

Una vez obtenida la cinética de crecimiento se determinaron los tiempos para realizar los tratamientos de elicitación con metil jasmonato (MeJa: 50, 100 y 150 μM) y ácido salicílico (AS: 180, 360 y 720 μM).

Las concentraciones mencionadas de cada elicitor se determinaron considerando la que generalmente es usada para elicitar en otros estudios, para MeJa de 100 μM y para AS 360 μM . Con esta referencia, se decidió realizar las elicitaciones con concentraciones más bajas: 50 y 180 μM respectivamente y más altas: 150 μM para MeJa y 720 μM de AS.

Se establecieron las suspensiones celulares en medio Taxliq en 20 matraces, se inocularon 10 g de callo a 60 ml de medio nutritivo. Después de dos semanas, se retiraron los agregados más grandes con ayuda de una gasa estéril y se reunieron todas las suspensiones para homogeneizar la población de células. Se dejó reposar durante dos horas y se retiraron 900 ml de sobrenadante con el fin de concentrar las suspensiones y obtener un mayor paquete celular. Se agregaron 320 ml de medio fresco y la suspensión resultante se separó en 40 matraces de 50 ml, agregando a cada uno 15 ml de suspensión celular. Para cada tratamiento se hicieron 5 repeticiones.

Los elicitores se disolvieron en etanol grado HPLC y se agregó la cantidad correspondiente de cada uno al día tres de establecida la suspensión en los matraces de 50 ml; al día catorce las células se separaron por centrifugación (6000 rpm, 10 minutos) y las muestras se almacenaron a -70°C .

ETAPA 2

5.2 Fitoquímica

Extracción

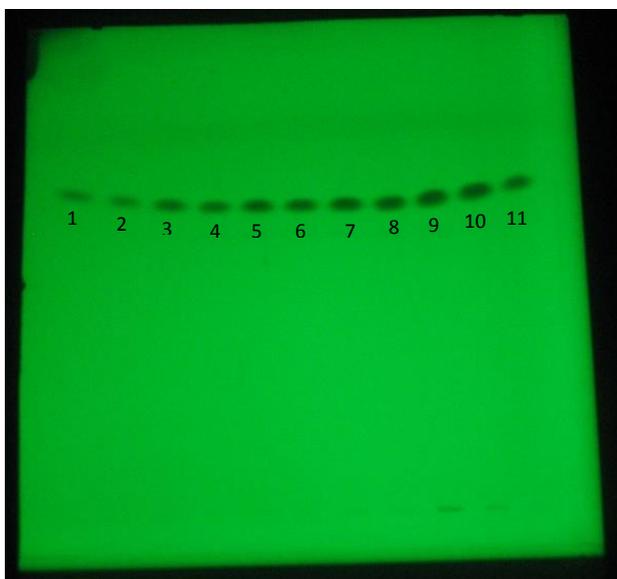
Las células se secaron por liofilización (LABCONCO[®], Freezone 2.5, 7522800) y se registró el peso seco de las células, posteriormente, se realizó la extracción selectiva con dos disolventes orgánicos (acetato de etilo y metanol) consecutivamente, considerando la interacción del paclitaxel con éstos. En la primera extracción, se agregaron 5 ml de acetato de etilo (AcOEt) a cada muestra manteniendo en agitación durante 24 horas, después se sonicaron durante 1 h (baño ultrasónico, Velaquin[®], 8892) y se filtraron recuperando el disolvente. Una vez evaporado el disolvente residual de las células, se procedió a la extracción con metanol (MeOH) empleando la misma secuencia de los extractos de ACOEt. Los extractos se depositaron en frascos y se determinó su rendimiento una vez evaporado el disolvente.

Para los medios nutritivos, se realizó una extracción líquido-líquido con ACOEt. El disolvente obtenido se evaporó a presión reducida a temperatura ambiente y se determinó el rendimiento del extracto.

De la fase acuosa resultante de la extracción con AcOEt, se tomaron 5 ml de cada muestra para ser liofilizados. Se agregaron 5 ml de MeOH a los medios liofilizados y se agitó vigorosamente, después se sonicó durante 1 hora. La mezcla se filtró con membranas de 0.22 μm y el filtrado se colectó en un frasco previamente pesado. Se evaporó el disolvente al vacío, por último se determinó el rendimiento del extracto.

Cuantificación de paclitaxel por cromatografía en capa fina

Para la cuantificación por cromatografía en capa fina se utilizó una curva de calibración con cinco niveles evaluada por densitometría. La fase estacionaria consistió en placas de vidrio de 20 x 10 cm precubiertas de gel de sílice G250 (Merck®, 60 F₂₅₄, 210-270 μm), preeluidas con cloroformo y metanol secuencialmente y activadas en una parrilla a 120 °C durante 1 hora para eliminar el agua y obtener una mejor separación de los componentes de los extractos. Las placas se desarrollaron hasta un frente de 7.5 cm en una cámara horizontal (CAMAG, Suiza) a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$; el eluyente fue una mezcla de cloroformo y metanol (7:1) preparada en el momento. Los disolventes usados fueron grado HPLC y todas las aplicaciones fueron por duplicado.



Carril	Cantidad de paclitaxel (μg)
1 – 2	5
3 – 4	10
5 – 6	15
7 – 8	20
9 -10	25
11	Desconocida

Figura 7. Curva de calibración en CCF de paclitaxel (Luz UV 254 nm)

El estándar utilizado fue paclitaxel con 95% pureza, (T7402, SIGMA®, EUA), del cual se preparó una solución stock (0.5 mg/ml) en metanol. Las distintas alícuotas de la solución se aplicaron utilizando un equipo automatizado ATS4 (CAMAG, Suiza). Una vez desarrollada la placa, se escaneó a 254 y 365 nm con un scanner TLC Scanner 3 (CAMAG, Suiza) para localizar y determinar el Rf del estándar. Posteriormente se obtuvo el espectro de absorción UV en el intervalo de 195 a 300 nm con la finalidad de caracterizar la respuesta del paclitaxel y seleccionar la longitud de onda ideal para la evaluación cuantitativa que fue 195 nm. La ecuación de la curva de calibración se obtuvo con los datos del área (fig. 7) en el programa winCATS v. 1.4.6.2002 (CAMAG, Suiza).

Los extractos fueron disueltos en diferentes disolventes orgánicos o mezclas de éstos (Anexo 2) para obtener concentraciones de 5mg/ml. De cada muestra se aplicaron 20 µl en banda de 3 mm, 100 µg cantidad final. En cada placa además, se aplicaron 5 µl de la disolución del estándar en dos zonas diferentes de la placa de manera alternada. Las placas se desarrollaron en una cámara horizontal (CAMAG, Suiza) a una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$; la fase móvil fue una mezcla de cloroformo y metanol (7:1). Una vez terminado el desarrollo, las placas se secaron a temperatura ambiente en una campana de extracción hasta eliminar el disolvente y se evaluaron a 195, 227 y 235 nm con el fin de elegir la longitud de onda en la que se presentara la mayor absorción, determinando 195 nm la ideal para la identificación de paclitaxel en las muestras, considerando el Rf del estándar registrado por el escáner (0.59-68). El escaneo se realizó a través del programa winCATS v. 1.4.6.2002 (CAMAG, Suiza) y se cuantificó tomando en cuenta el área bajo la curva de los picos asignados. El espectro de absorción UV (195- 300 nm) de las bandas asignadas como paclitaxel se obtuvo con el TLC scanner 3. Finalmente, las placas se revelaron con reactivo de Liebermann-Burchard (Anexo 3).

6. Resultados

6.1 Cultivo de tejidos vegetales

Establecimiento de líneas celulares de T. globosa

Los cultivos celulares empleados en el presente estudio, fueron producto de una inducción a callo a partir de tallos jóvenes de *T. globosa*, mantenidos en oscuridad a $23^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Durante el primer año de mantenimiento y proliferación de callos, éstos se subcultivaron cada tres semanas en medio *Tax* (Tabla 1), sin embargo, éstos presentaron siempre un color café oscuro, producto de la oxidación, la cual

afectó el crecimiento celular, por lo que se decidió espaciar más los subcultivos, realizándolos cada cuatro semanas. Con este esquema, los callos se mantuvieron durante tres años, y en cada subcultivo se eliminó el tejido oxidado hasta obtener lotes altamente prolíferos y sin oxidación (fig. 8).

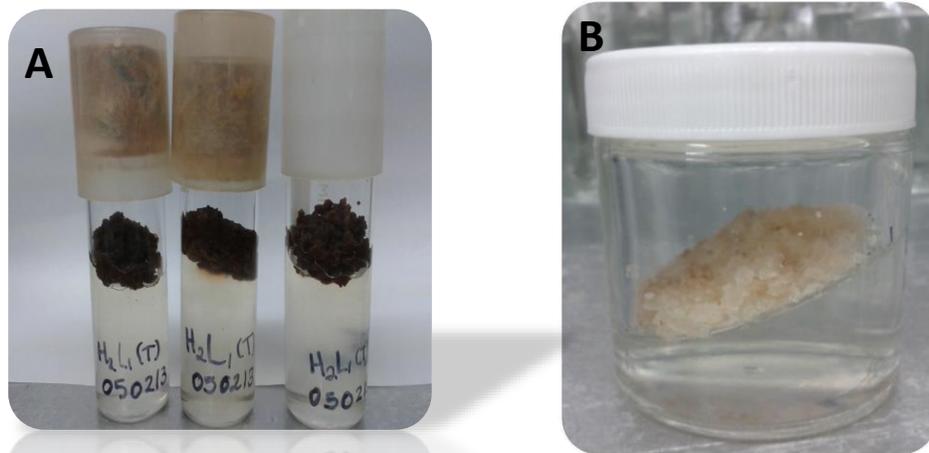


Figura 8. Callos de *T. globosa* A) Callos de un año con alta oxidación, B) Líneas celulares con baja oxidación y alta proliferación celular con seis años de mantenimiento.

Evaluación de crecimiento de cultivos en suspensión de T. globosa

Una vez obtenido suficiente callo con poca oxidación, se establecieron suspensiones celulares. Para caracterizar el cultivo fue necesario evaluar el crecimiento celular por medio de parámetros como el peso fresco y seco, el índice de crecimiento, el tiempo de duplicación y la velocidad específica de crecimiento.

El crecimiento de los cultivos celulares en suspensión de *T. globosa* se expresó a través del peso fresco y seco durante 15 días, tomando muestras cada cuatro días realizando 10 repeticiones. La figura 9 muestra las diferentes etapas del crecimiento con relación al peso seco, en donde la etapa *lag* abarca desde el día inicial hasta el día 5, seguida de la etapa exponencial, días 5 al 8, en donde las células se encuentran en condiciones óptimas para su reproducción, dando lugar a células jóvenes con una forma isodiamétrica. Posteriormente el peso seco disminuye hasta el día 12 y finalmente se presenta un incremento discreto hasta el día 16. En cuanto al peso fresco, la etapa *lag* tuvo una duración similar que en el peso seco, sin embargo no tuvo disminución pronunciada. La etapa logarítmica se presentó hasta el día 8 con un incremento 6 veces mayor que el peso inicial y la pérdida de peso tuvo lugar hasta

los 12 días. Es de esperarse que haya un mayor incremento de peso fresco que de seco ya que las células se encuentran hidratadas en esta condición. Al final del ciclo hubo una pérdida tanto de peso fresco como seco, ya que el cultivo inicia con un peso fresco de 0.00584 g y al final el registrado es de 0.00582 g; en cuanto al peso seco la disminución fue de 0.0162 g.

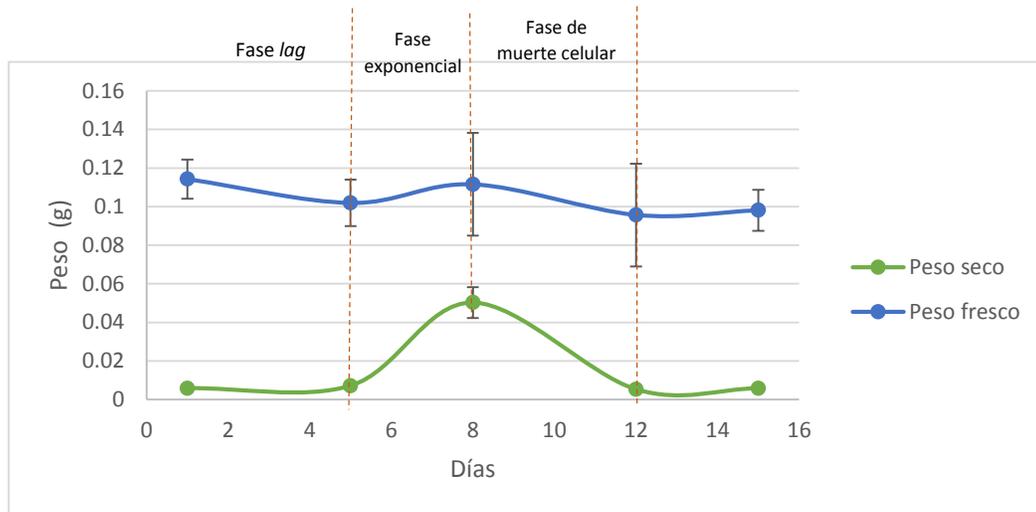


Figura 9. Cinética de crecimiento de células en suspensión de *T. globosa*

En cuanto a los parámetros de crecimiento calculados, en la tabla 3 se puede observar que para el periodo de máximo crecimiento, días 5 al 8, el índice de crecimiento fue de 6.01, y la velocidad específica de 0.65 g/día, lo que significa el tiempo de duplicación requerido es de aproximadamente 1 día.

Tabla 3. Parámetros de crecimiento de *T. globosa*

Parámetro de crecimiento	Valores
Índice de crecimiento	6.01
Velocidad específica de crecimiento (g/día)	0.65
Tiempo de duplicación (días)	1.06

Elicitación con metil jasmonato y ácido salicílico

Los tiempos de elicitación, cosecha de células y obtención de medio nutritivo se establecieron con base en la cinética de crecimiento. La elicitación se realizó en el día tres y la cosecha en el día 15, pues a partir de la fase estacionaria hay un aumento en la producción y acumulación de metabolitos secundarios.

La relación pf/ps se calculó para cada uno de los tratamientos de elicitación y se observó que en los tratamientos de MeJa, aumentó directamente con la concentración del elicitor, lo cual indica que al aumentar la concentración de MeJa las células almacenaron una mayor cantidad de agua. Dicha relación se mantuvo muy similar entre el control y los tratamientos (fig. 10).

En la elicitación con AS, la relación pf/ps fue inversamente proporcional a la concentración del elicitor. El control presentó la mayor relación respecto a los tratamientos lo cual indica que al aumentar la concentración del elicitor disminuye el agua en el interior de las células.

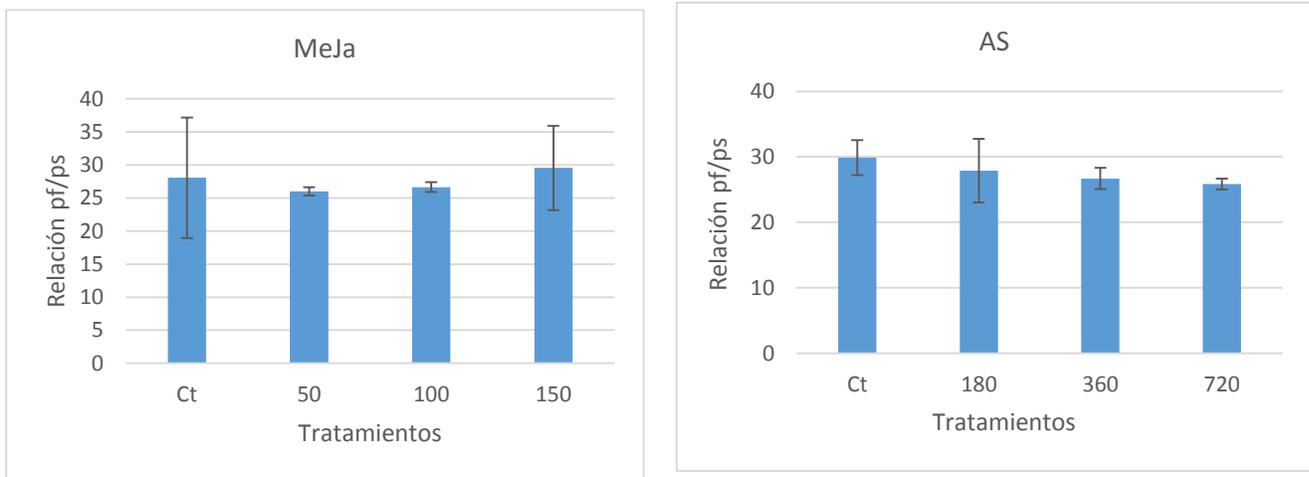


Figura 10. Relación pf/ps en los tratamientos de elicitación. Barras verticales indican la desviación estándar.

Al comparar cualitativamente las suspensiones celulares al final del tratamiento, se observó una mayor oxidación en las células elicidadas con metil jasmonato (fig. 11), mientras que en las de ácido salicílico, se apreciaron cultivos con una coloración más clara (fig. 12).

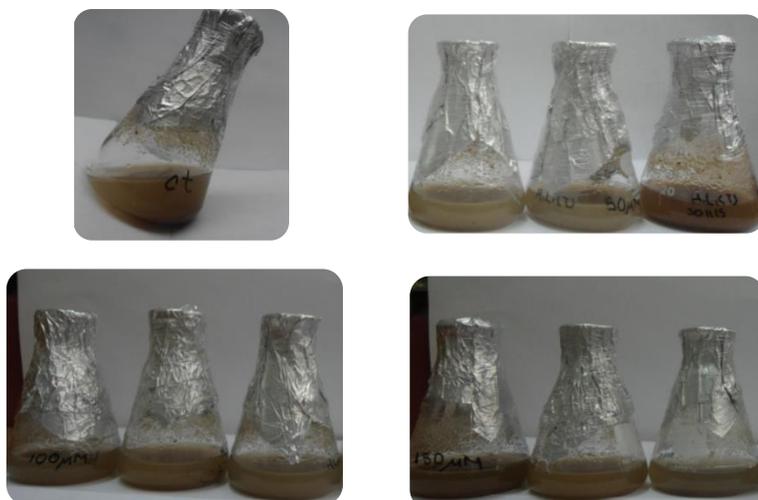


Figura 11. Cultivos celulares de *T. globosa* a 10 días de elicitación con MeJa. A) Control B) 50 μ M C) 100 μ M D)150 μ M

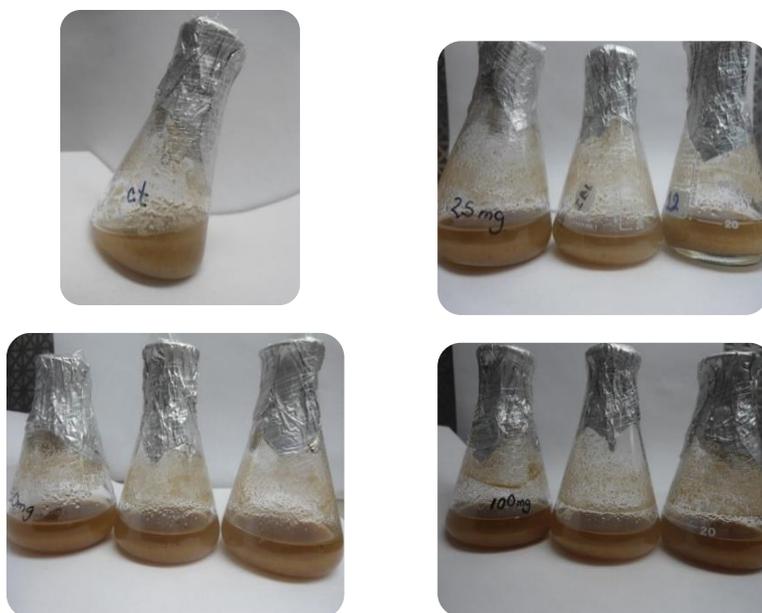


Figura 12. Cultivos celulares de *T. globosa* a 10 días de elicitación con AS A) Control B) 180 μ M C) 320 μ M D) 720 μ M

6.2 Fitoquímica

6.2.1 Extracción

Rendimiento de extractos

La comparación del rendimiento de los extractos de AcOEt y MeOH de cada tratamiento indicó ausencia de una respuesta diferencial asociada a la concentración; sin embargo hubo diferencia entre elicitores, ya que los tratamientos con MeJa presentaron un mayor rendimiento que los de AS.

En los tratamientos de MeJa hubo diferencias respecto al disolvente, el rendimiento de los extractos metanólicos de células y medios nutritivos fue 5 y 15 veces mayor respectivamente que el de los de AcOEt (fig.13).

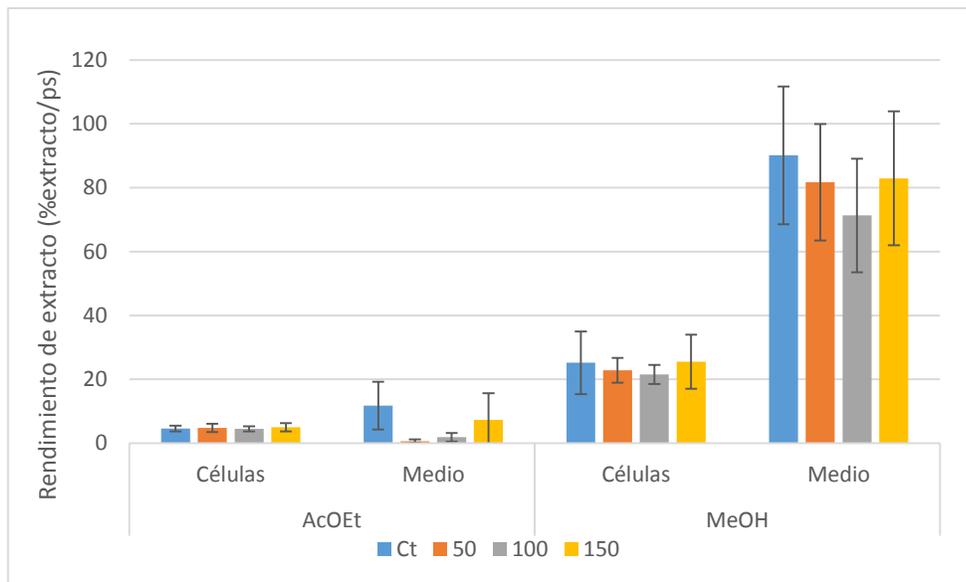


Figura 13. Rendimiento de extractos de tratamientos de elicitación con MeJa. Barras verticales indican la desviación estándar.

En los tratamientos de AS, los extractos metanólicos presentaron también un mayor rendimiento respecto a los de AcOEt, el extracto metanólico de células resultó 10 veces mayor y en los medios nutritivos fue 24 veces mayor (fig.14).

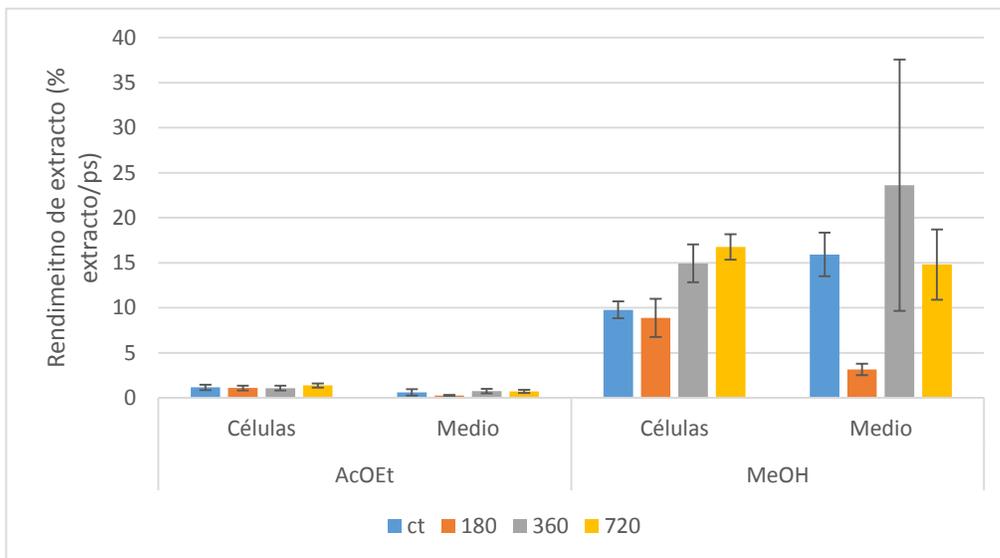


Figura 14 Rendimiento de extractos de tratamientos de elicitación con AS. Barras verticales indican desviación estándar.

6. 2. 2 Elicitación

Extractos de cultivos elicitados con metil jasmonato

El Rf del estándar (st), aplicado en las orillas de cada placa, presentó variaciones, por lo que se estableció un un intervalo de escaneo (cuadro rojo en las figuras) mismo que se utilizó durante la asignación de picos después del escaneo a 195nm. Los perfiles cromatográficos mostraron diferencias entre los extractos de AcOEt y MeOH después de aplicar el revelador de Liebermann – Burchard.

Los extractos de AcOEt de las células elicitadas con MeJa, presentaron el mismo número de bandas (8 bandas diferenciadas) indicando que la concentración del elicitor no tiene efecto en la presencia de esos compuestos, sin embargo, hay un patrón diferente en la intensidad de las bandas.

En la observación del perfil cromatográfico, las bandas correspondientes a paclitaxel son tenues, sin embargo, en el escaneo con el equipo se registra claramente en un intervalo de Rf establecido para el estándar (0.64-0.72) (fig. 15).

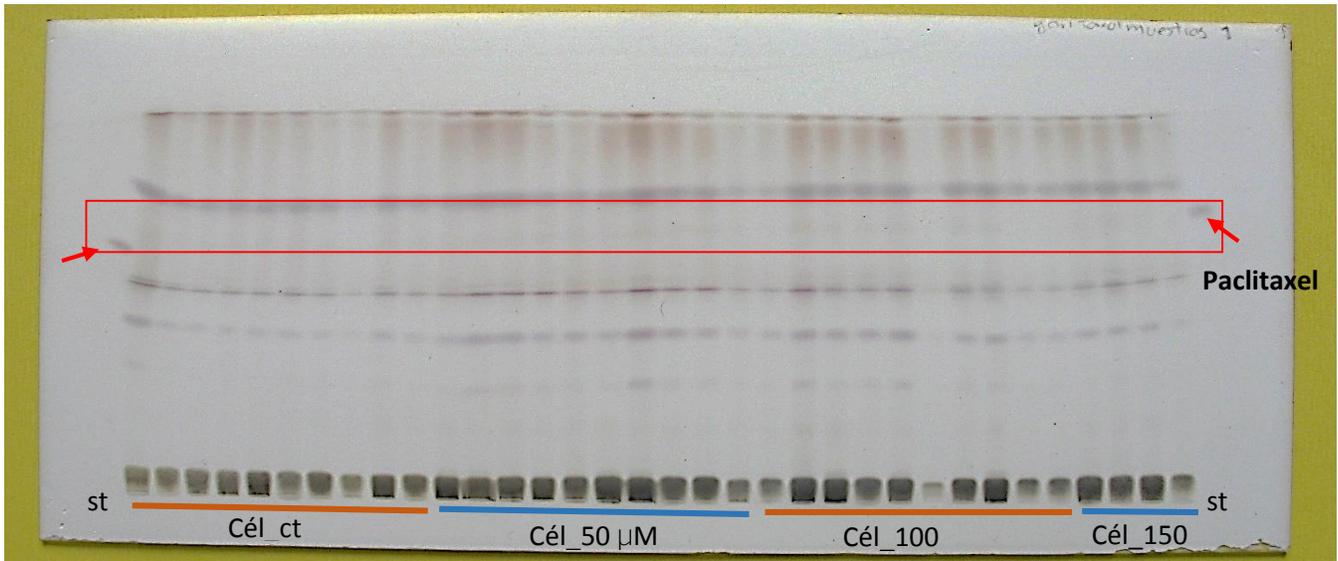


Figura 15. CCF de extractos de AcOEt de células. Revelador de Liebermann-Burchard, VIS.

Los extractos de AcOEt de los medios nutritivos, presentaron un mayor número de bandas respecto a los extractos de células. En las muestras de medios nutritivos con elicitor, se observó la presencia de una mayor cantidad de bandas (7 bandas) en comparación con las muestras del ct (3 bandas); lo cual indica que al adicionar el elicitor hubo un aumento en la producción de compuestos secretados al medio

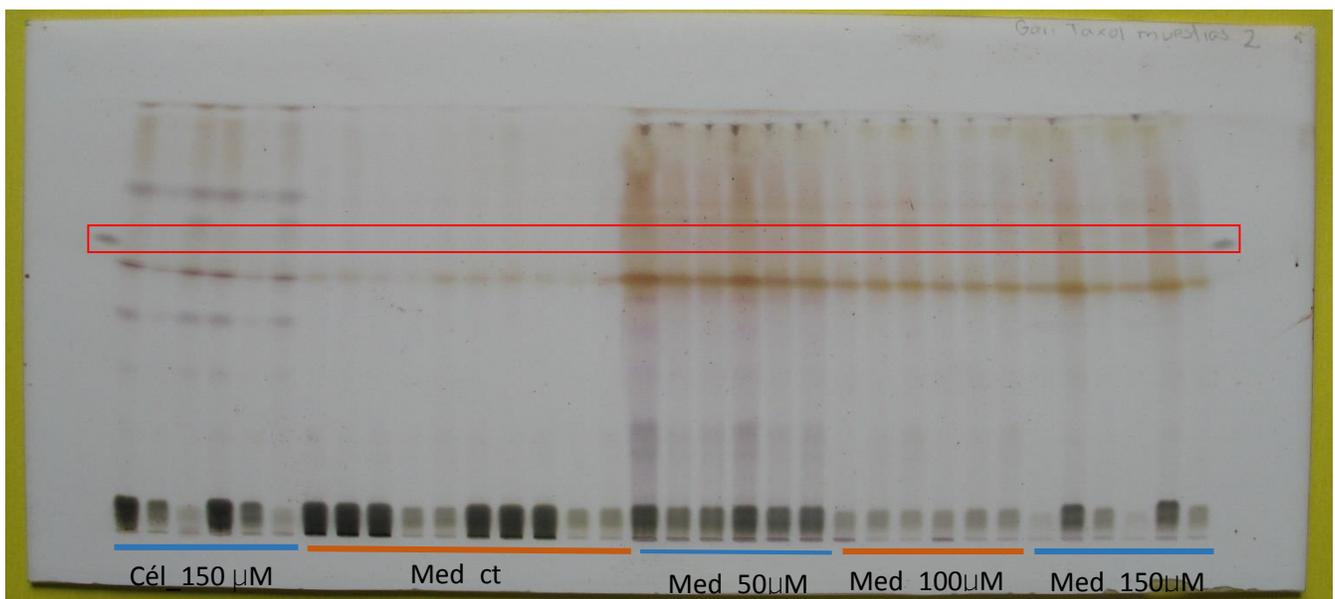


Figura 16. CCF de extractos de AcOEt células (inicio) y medios nutritivos. Revelador de Liebermann-Burchard, VIS.

nutritivo, además se observó una mayor intensidad de las bandas lo cual indica una mayor la cantidad de ciertos compuestos (fig.16).

Los cromatogramas de los extractos metanólicos, tanto de células (fig.17) como de medios (fig.18), muestran menor número de bandas que los de AcOEt en este sistema de elución. En el caso de las células hay 4 bandas y en el de los medios nutritivos hay únicamente 2. Es visible una acumulación cercana al punto de aplicación, debido a que en los extractos metanólicos presentan una mayor cantidad de compuestos polares, a diferencia de los de AcOEt. En el intervalo de Rf identificado para paclitaxel las bandas están mejor definidas en los extractos de células.

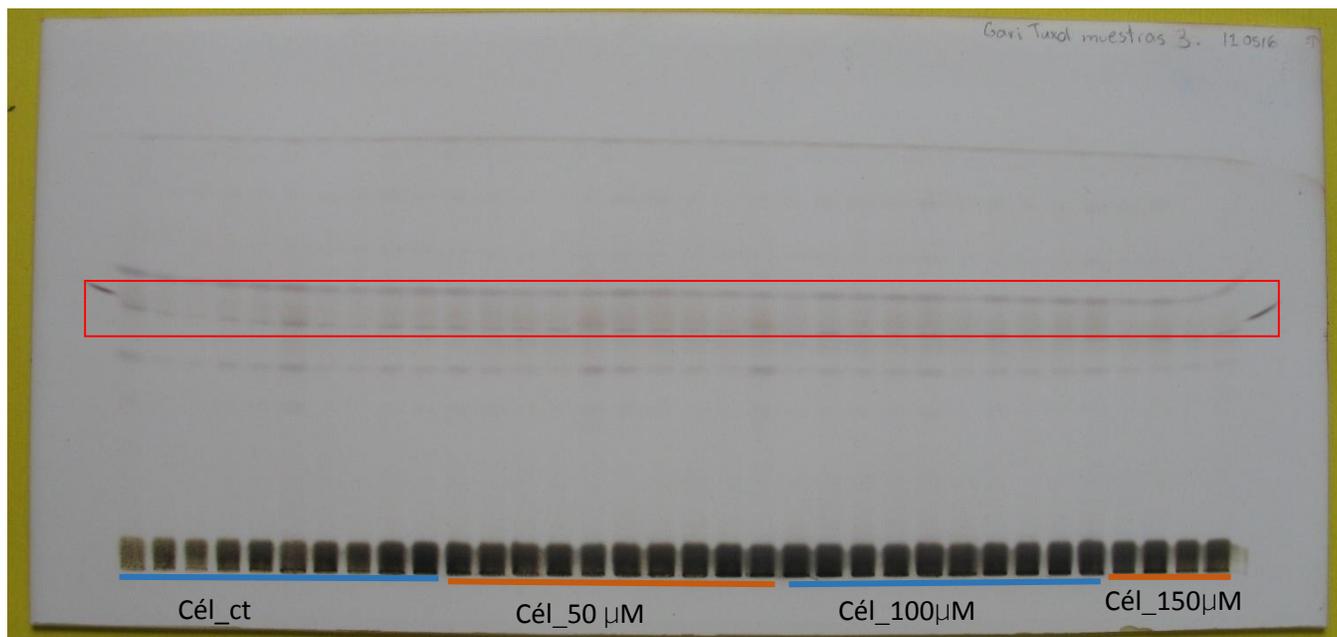


Figura 17. CCF de extractos metanólicos de células. Revelador de Lieberman-Burchard, VIS

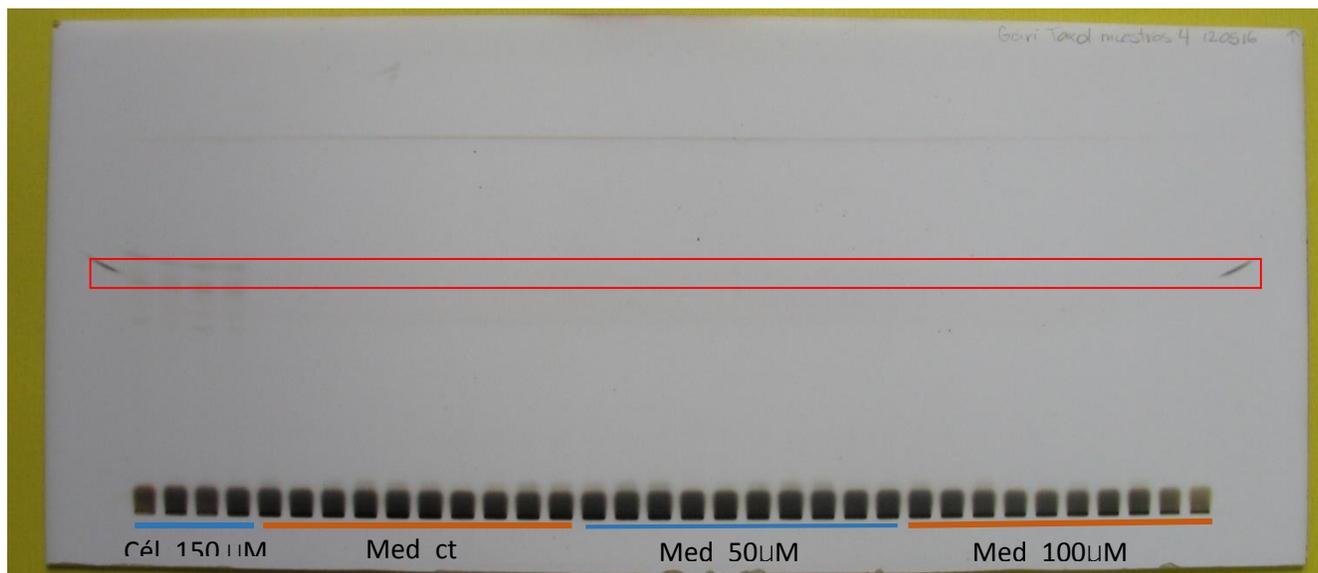


Figura 18. CCF de extractos metanólicos de células (inicio) y medios nutritivos. Reactivo de Lieberman-Burchard, VIS.

Extractos de cultivos elicitados con ácido salicílico

Los extractos de AcOEt y MeOH de células y medios nutritivos de los tratamientos de AS fueron diferentes a los de MeJa, pues se observó una mayor cantidad de bandas (10 bandas) y con una mejor separación a lo largo de toda la placa. En los extractos de AcOEt de las células al igual que en el tratamiento con MeJa no se observaron diferencias en el número de bandas entre las diferentes concentraciones del elicitor. Los extractos tanto de las células como de los medios, presentaron 2 bandas con un Rf semejante al de paclitaxel (figs.19 a 24).

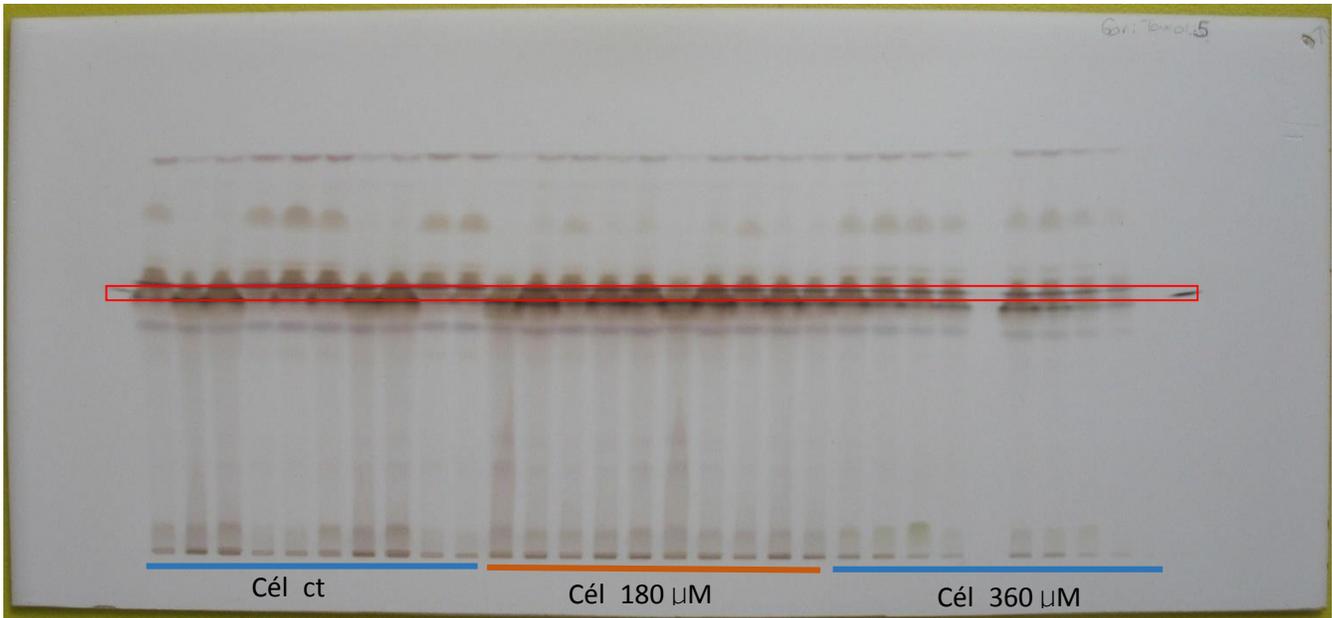


Figura 19. CCF de extractos de AcOEt de Células. Revelador de Lieberman-Burchard, VIS.

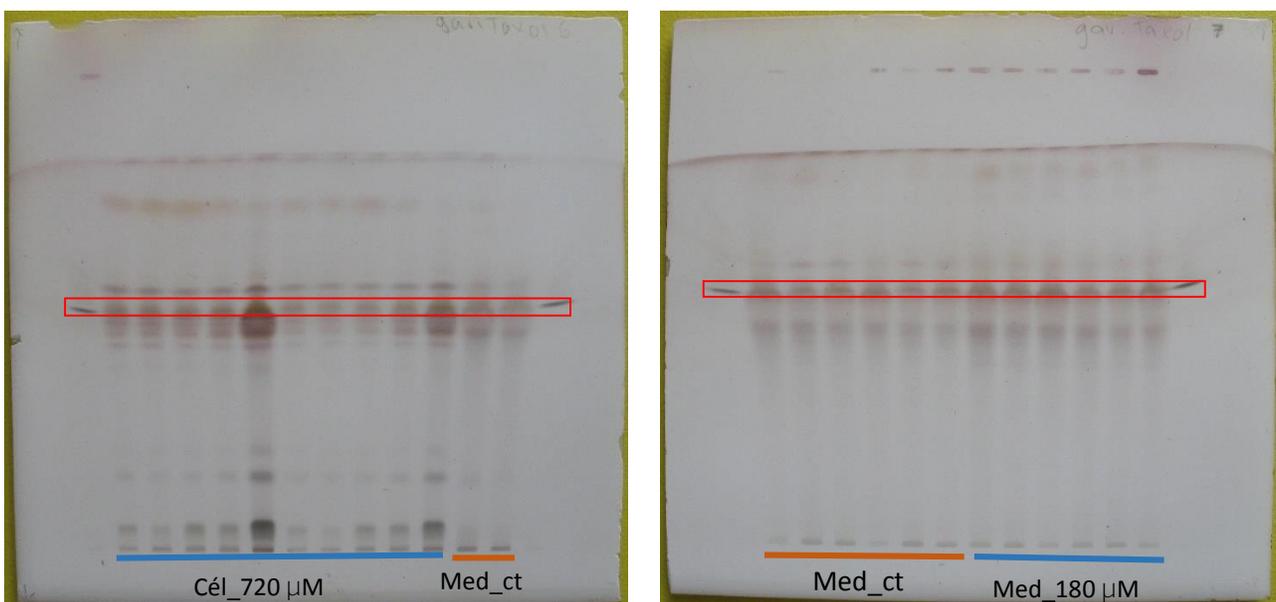


Figura 20. CCF de extractos de AcOEt. Células y medios nutritivos. Revelador de Lieberman-Burchard, VIS.

Como se mencionó anteriormente, los extractos metanólicos de células y medios nutritivos presentaron un mayor número de bandas en comparación con los extractos metanólicos de la elicitación de MeJa, se observaron 12 bandas en los extractos de células y 6 en los de medios (figs 21 a 24).

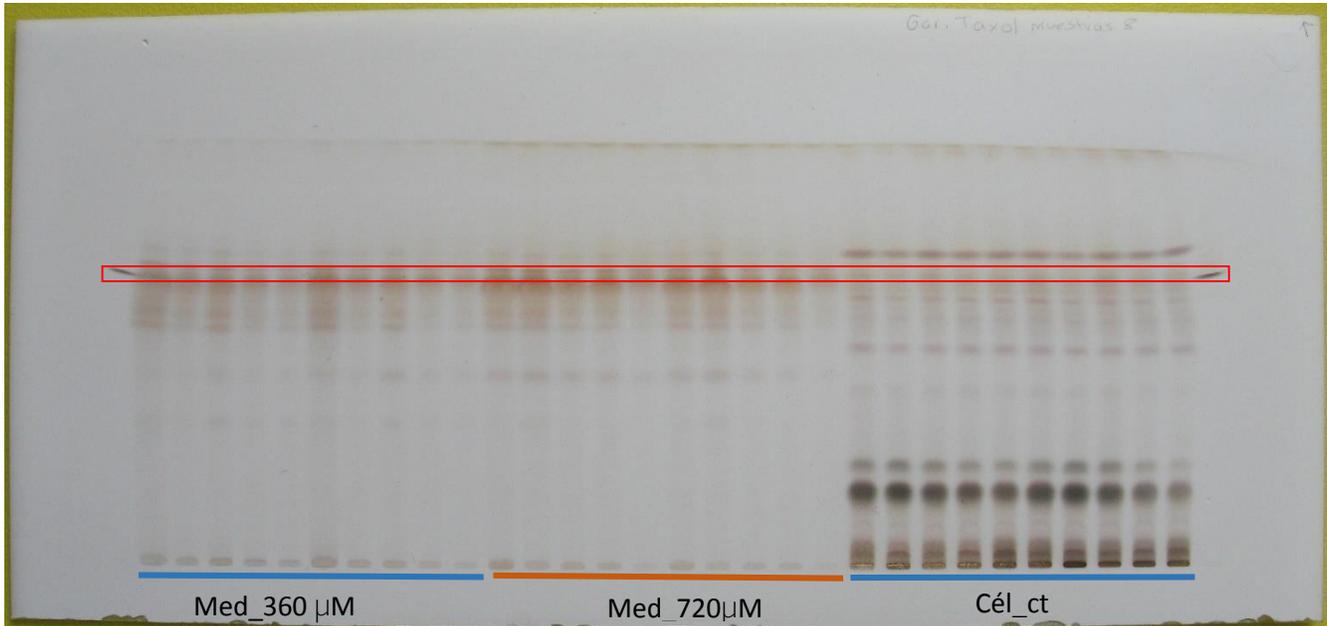


Figura 21. CCF de extractos de AcOEt, medios nutritivos (Med_360 y Med_720). Extractos metanólicos de células (Cél_ct). Reactivo de Lieberman-Burchard, VIS

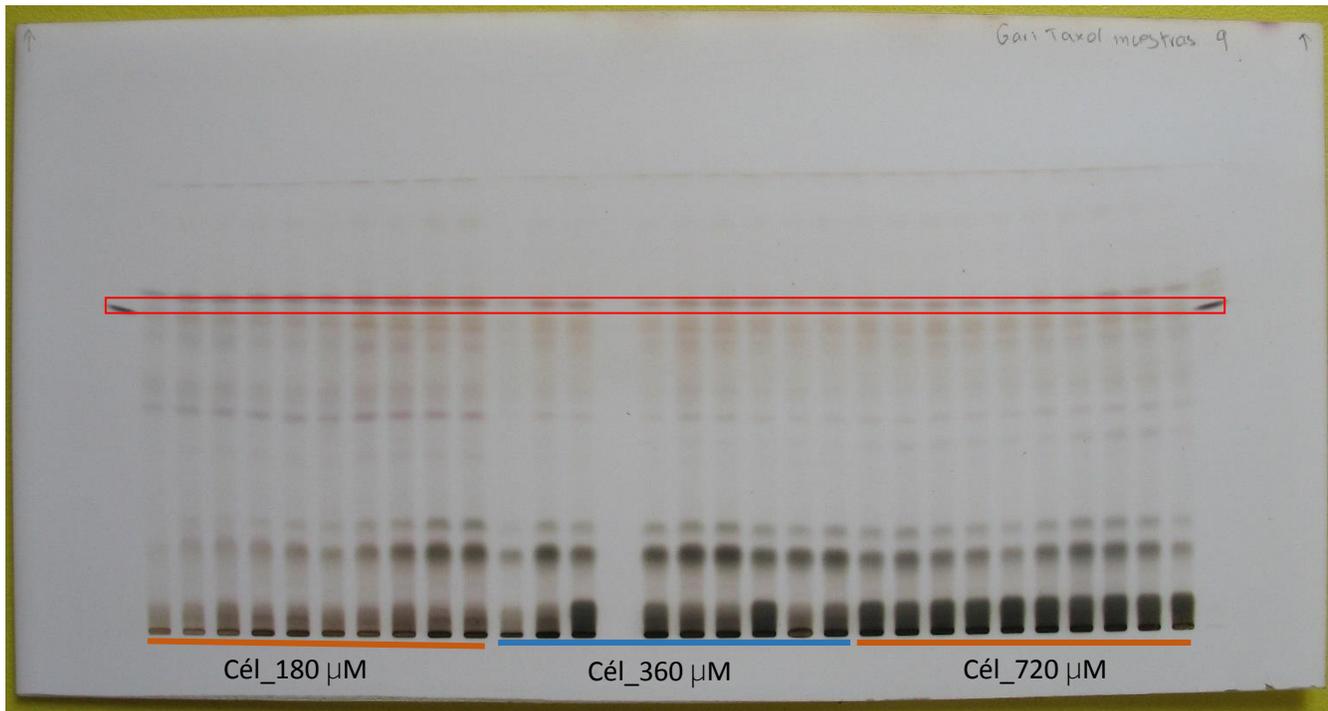


Figura 22. CCF de extractos metanólicos de células. Reactivo de Lieberman-Burchard, VIS.

Aunque los extractos metanólicos de células presentaron la misma cantidad de bandas, se observó una mayor intensidad en las bandas que presentan menor polaridad de los tratamientos de 360 y 720 μM (fig. 22). En los extractos de medios se observó diferencia respecto al ct, lo cual indica que la presencia del elicitor dio lugar a la producción de compuestos así como su secreción al medio. En el intervalo elegido para identificar paclitaxel, se observaron bandas muy tenues (fig. 23 y 24).

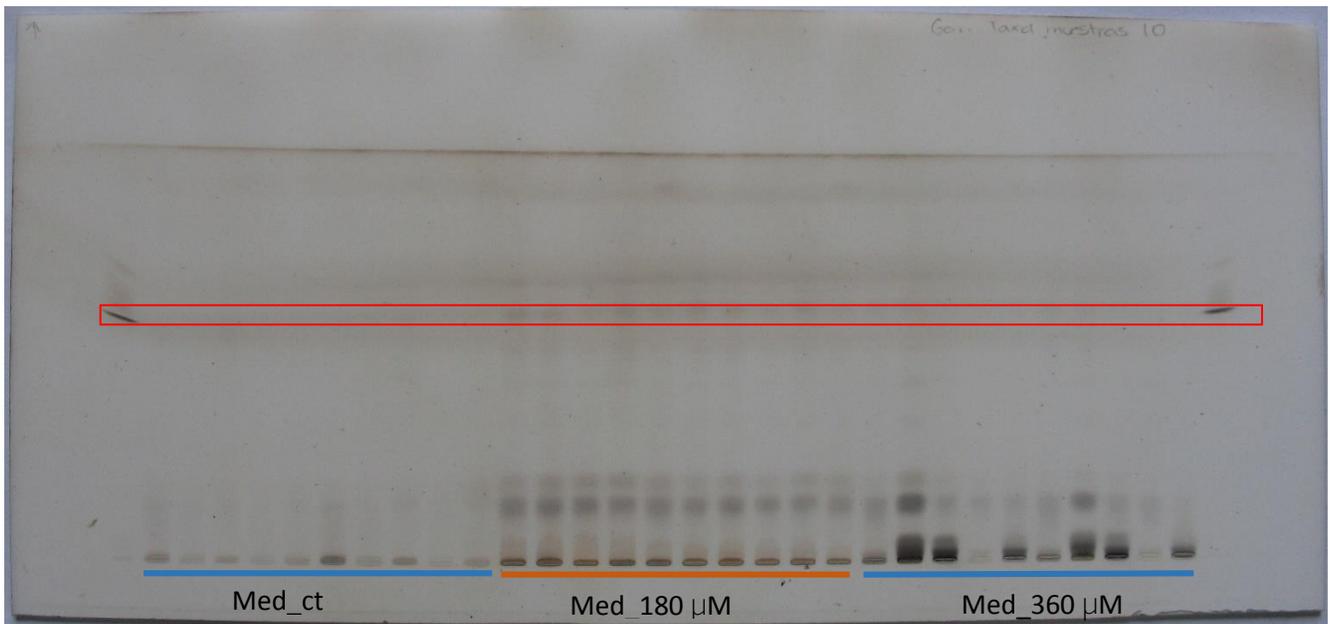


Figura 23. CCF de extractos metanólicos de medio nutritivo. Reactivo de Lieberman-Burchard, VIS

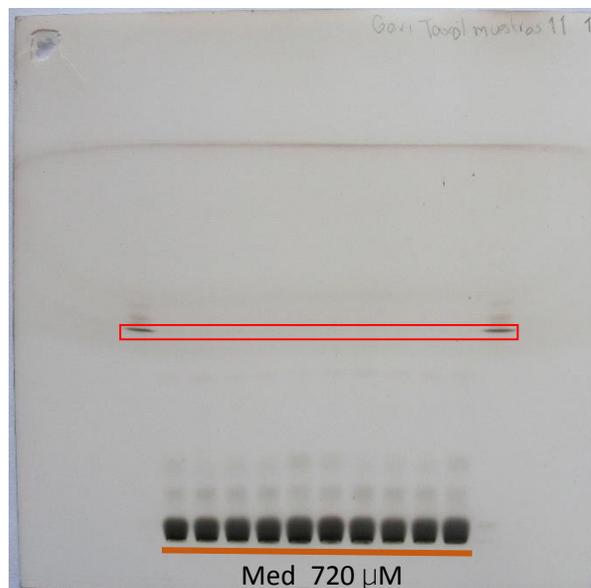


Figura 24. CCF de extractos metanólicos de medio nutritivo. Reactivo de Lieberman-Burchard, VIS

6.2.3 Cuantificación de paclitaxel

Como se pudo observar en los perfiles cromatográficos, hubo bandas con Rf muy cercano al de paclitaxel. Para realizar la identificación del mismo se determinó el espectro de absorción de paclitaxel con la curva de calibración en la que se aplicaron concentraciones entre 5 y 25 μg . La obtención de os espectros de absorción del compuesto a diferentes concentraciones permitió contar con los elementos adecuados de comparación con los espectros de las bandas implicadas en las muestras de los tratamientos de elicitación. El espectro de absorción se determinó en un intervalo de longitud de onda en donde se observan los máximos de absorción del paclitaxel, La discriminación de las bandas se basó en su respuesta a 195 nm dentro del intervalo de Rf determinada en cada perfil cromatográfico y posteriormente en la comparación del espectro de absorción UV en un intervalo de longitud de onda en donde se observaron los máximos de absorción de paclitaxel (195 a 300 nm). (Figs. 25 a 29).

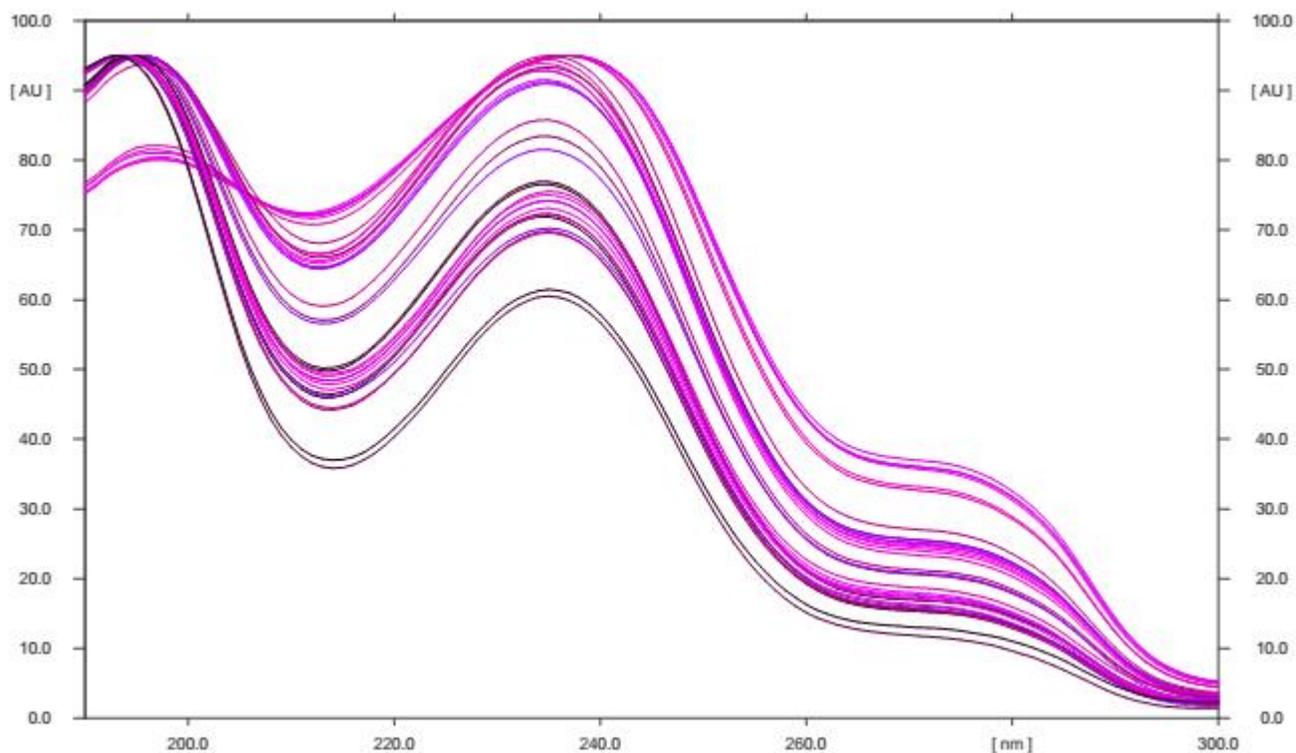


Figura 25. Espectros de absorción de diferentes concentraciones de paclitaxel. UV (195-300 nm)

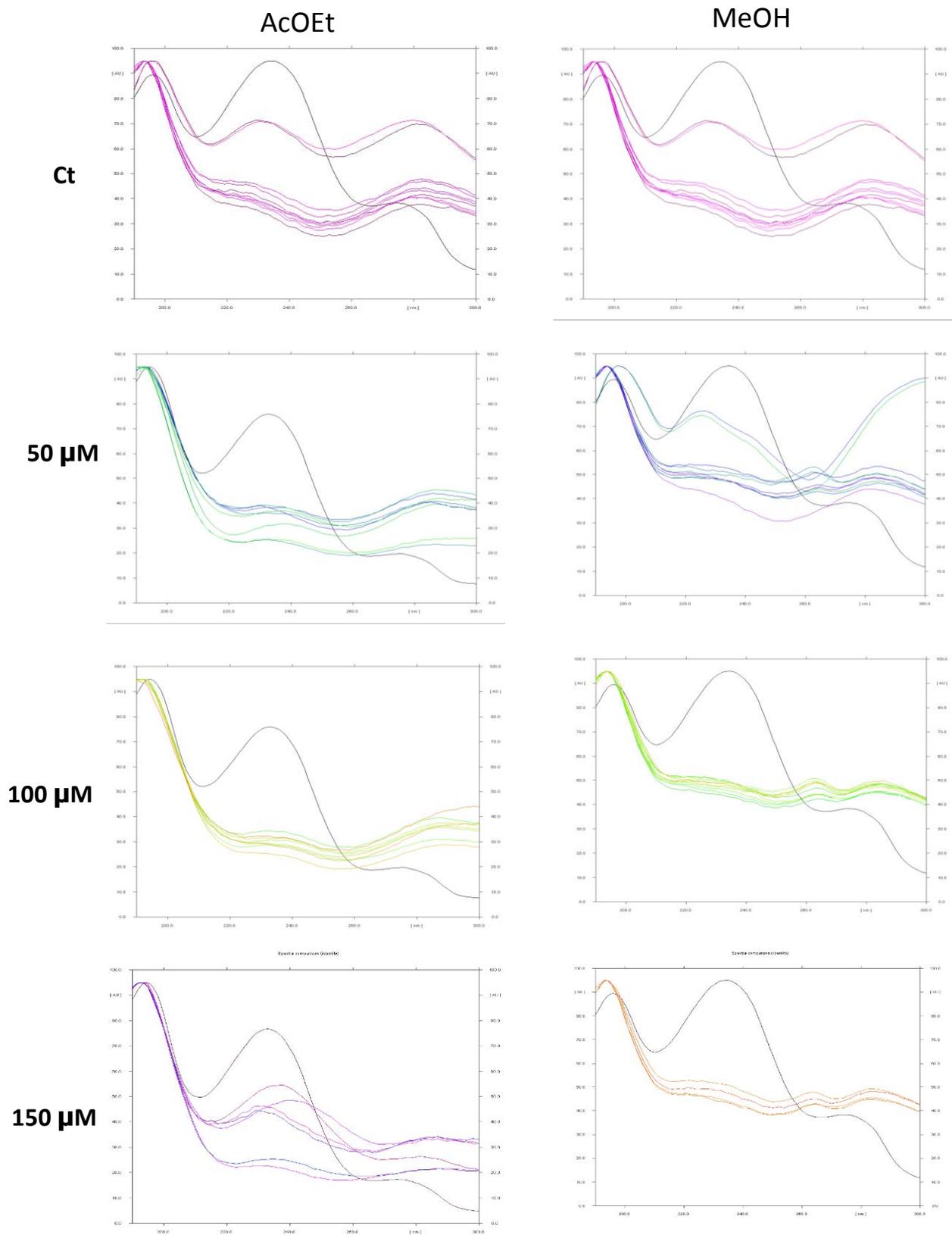


Figura 26. Espectros de absorción de bandas con Rf parecido a paclitaxel de extractos de células. Elicitación con MeJa. UV (195-300 nm).

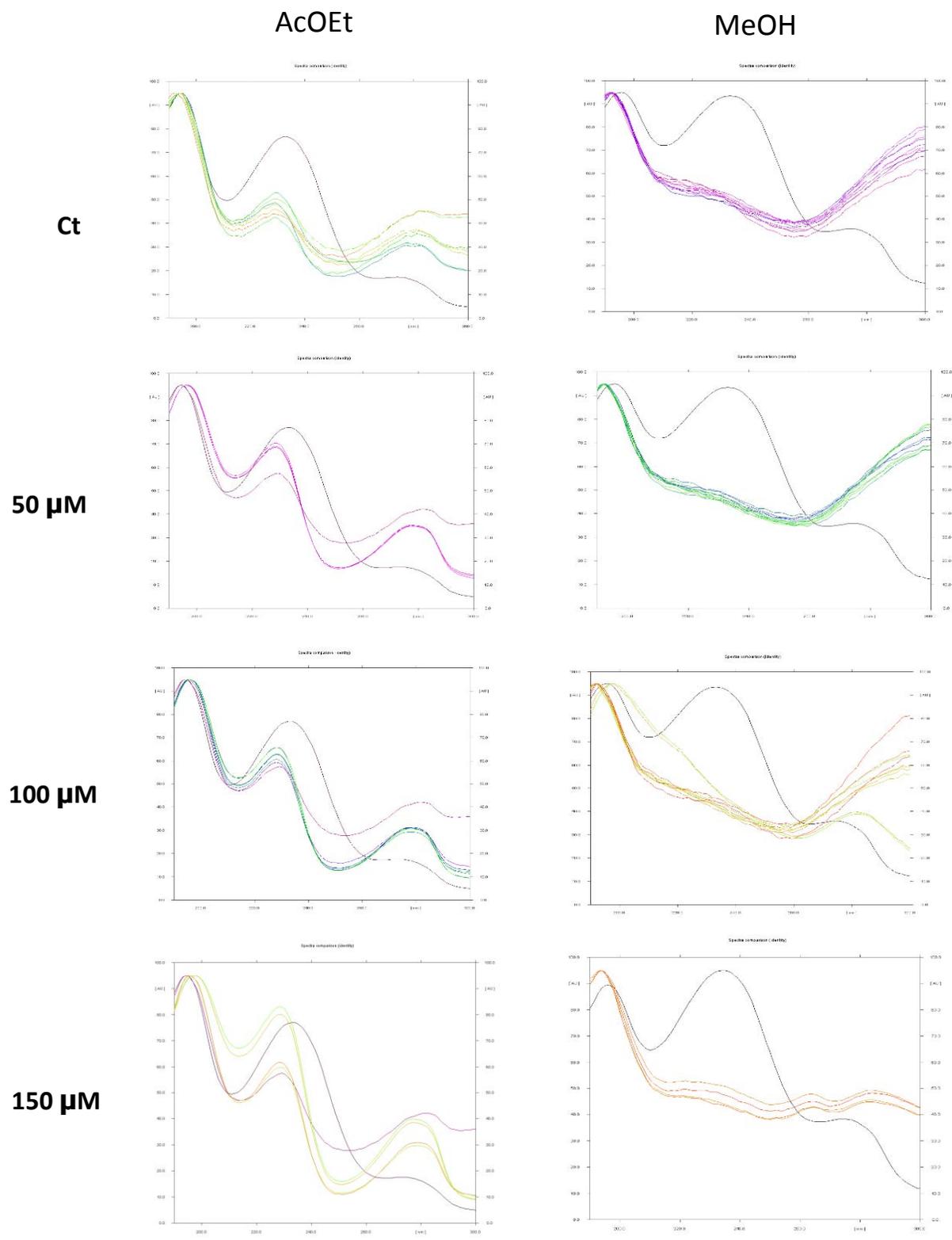


Figura 27. Espectros de absorción de bandas con Rf parecido a paclitaxel de extractos de medios nutritivos. Elicitación con MeJa. UV (195-300 nm).

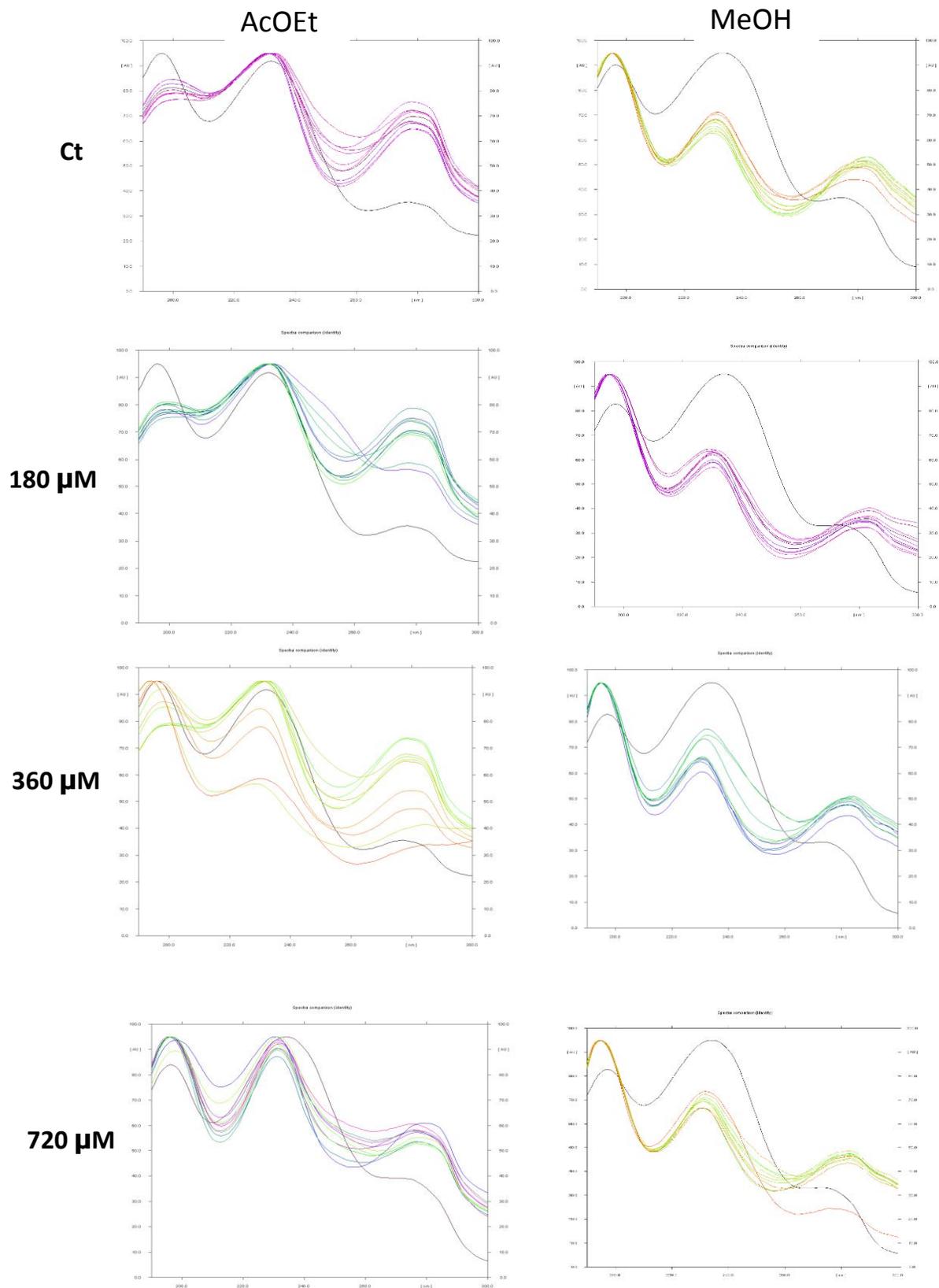


Figura 28. Espectros de absorción de bandas con Rf parecido a paclitaxel de extractos de células. Elicitación con AS. UV (195-300 nm).

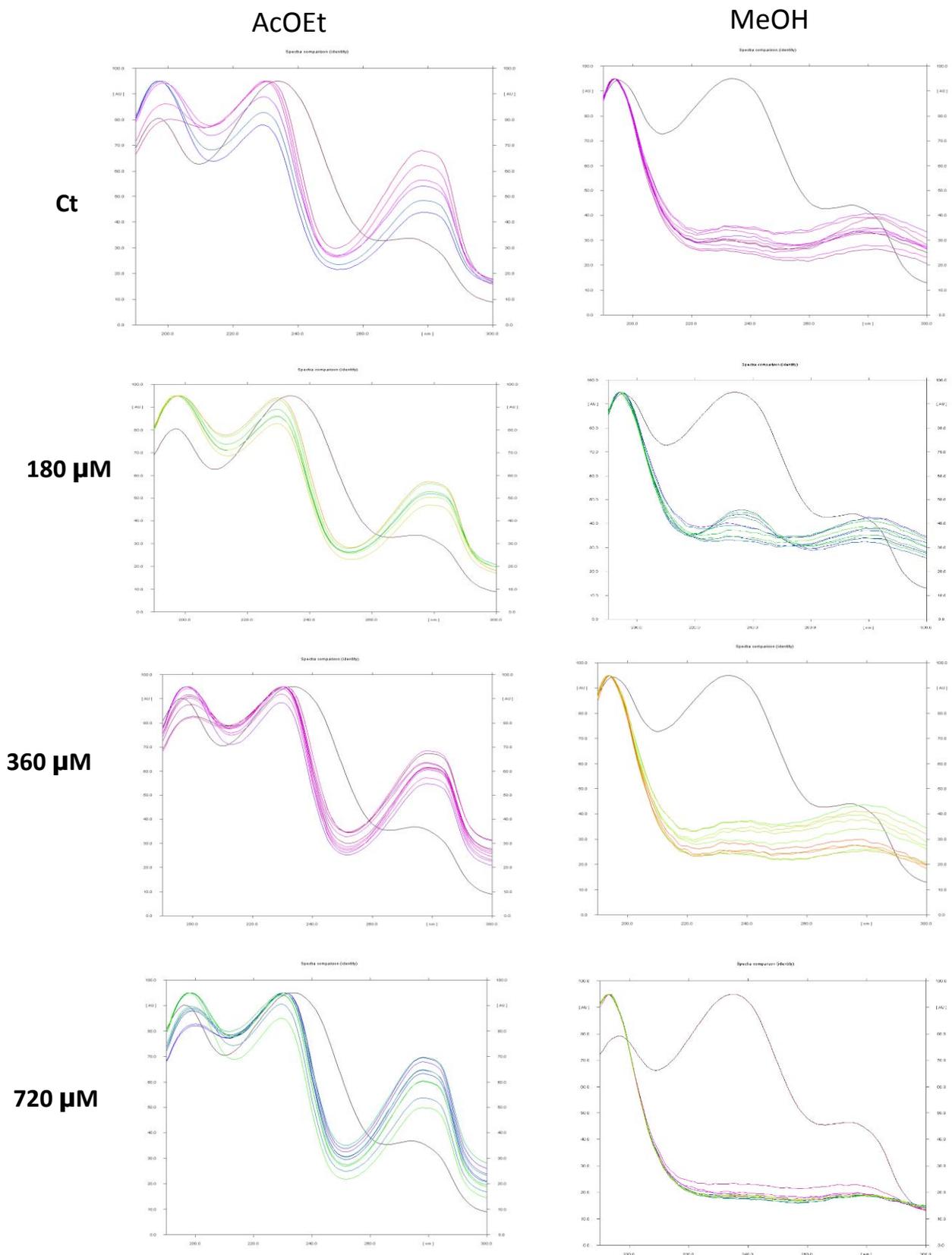


Figura 29. Espectros de absorción de bandas con Rf parecidos a paclitaxel de extractos de medios nutritivos. Elicitación con AS. UV (195-300 nm).

Con la información del espectro, se identificó la presencia de paclitaxel sólo en extractos de acetato de etilo de los medios nutritivos pertenecientes a la elicitación con MeJa (figs. 26 y 27). La mayor concentración de paclitaxel por gramo de peso seco se obtuvo en el control y en cuanto a los tratamientos con las diferentes concentraciones de elicitor, las células con la mayor concentración de MeJa (150 μM) presentaron la mayor cantidad del compuesto y el tratamiento que presentó la menor cantidad fue el de menor intensidad (50 μM), presentando una relación directamente proporcional. (fig. 30).

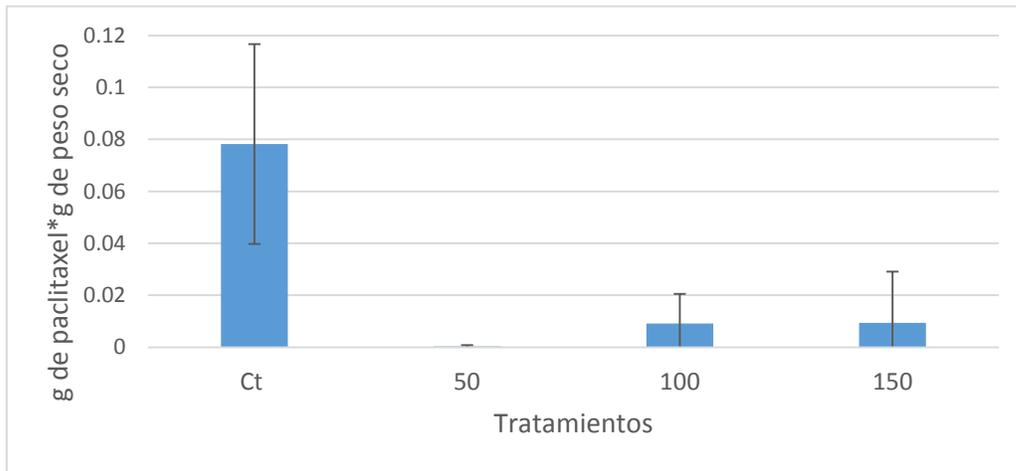


Figura 30. Concentración de paclitaxel en medio nutritivo de cultivos elicitados con MeJa en extractos de AcOEt

Por el contrario, la elicitación con AS se asoció con la presencia de paclitaxel en los extractos de acetato de etilo de células y medios nutritivos así como en los metanólicos de células (fig. 31).

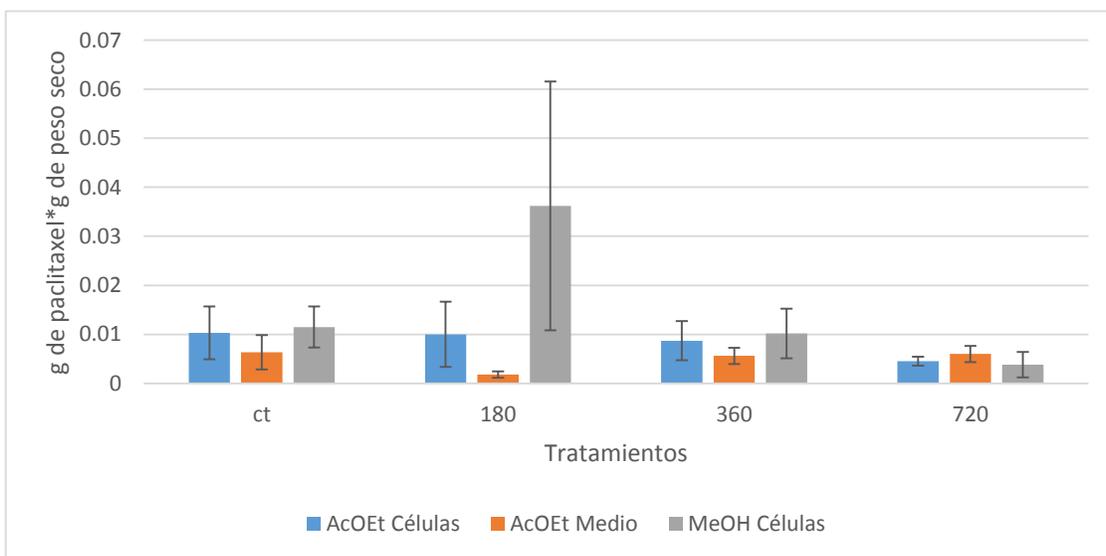


Figura 31. Concentración de paclitaxel en los extractos de células y medios nutritivos de cultivos elicitados con AS

En todos los casos, la producción total de paclitaxel se obtuvo sumando las cantidades en todos los extractos de cada tratamiento (fig. 30 y 32). En el tratamiento de elicitación con 180 μM de AS (el tratamiento de baja concentración) se observó una mayor cantidad de paclitaxel. Siendo el extracto metanólico de las células el que contiene la mayor proporción de paclitaxel (fig. 32).

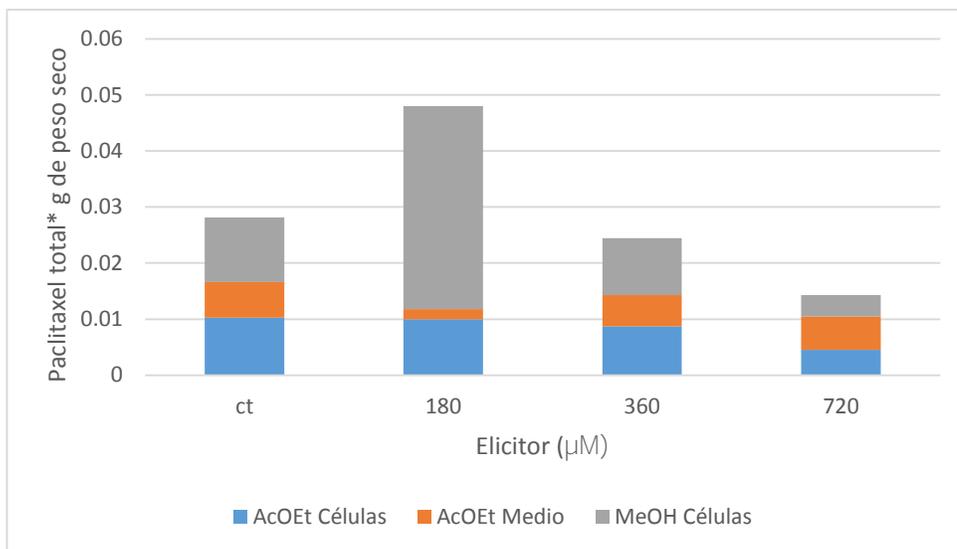


Figura 32. Paclitaxel total por tratamiento de elicitación con AS

El paclitaxel detectado en los tratamientos de MeJa sólo provino del medio nutritivo (fig. 30), infiriendo una secreción total del compuesto, por el contrario en el caso de los tratamientos de AS, hubo secreción y también almacenamiento en las células, el cálculo de porcentaje de paclitaxel secretado para los tratamientos con AS, indicó que el tratamiento de 720 μM secretó la mayor cantidad de paclitaxel (fig. 33).

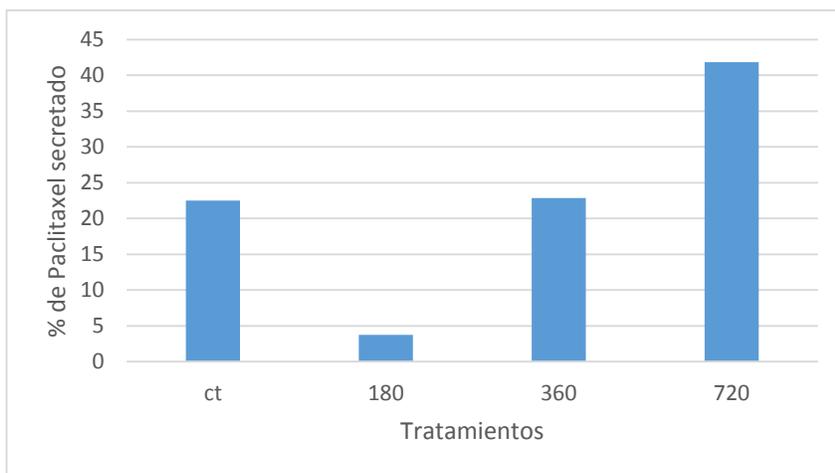


Figura 33. Porcentaje de paclitaxel en el medio nutritivo en tratamientos con AS

En la elicitación con MeJa, la relación de la producción de paclitaxel con el peso seco se observó que la biomasa no presentó cambios evidentes al aumentar la concentración del elicitor; sin embargo, la mayor concentración de paclitaxel se presentó en el control. En los tratamientos se registró en cantidades muy parecidas en 100 y 150 μM mientras que en 50 μM se obtuvo la cantidad más baja (fig. 34).

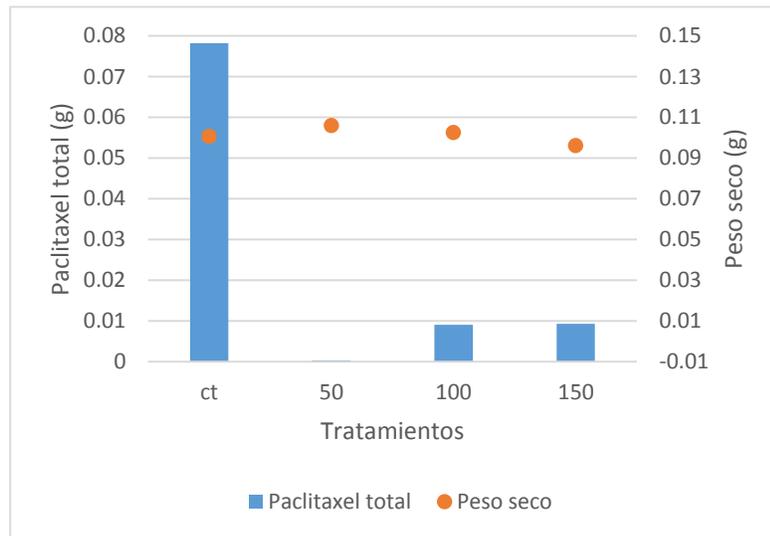


Figura 34. Producción de paclitaxel y peso seco final en los tratamientos con MeJa

En la elicitación con AS, se observó que al aumentar la concentración del elicitor hubo una disminución de peso seco un poco más pronunciada respecto a los tratamientos de MeJA. Se apreció una relación inversamente proporcional de la cantidad total de paclitaxel y la concentración del elicitor (fig.35).

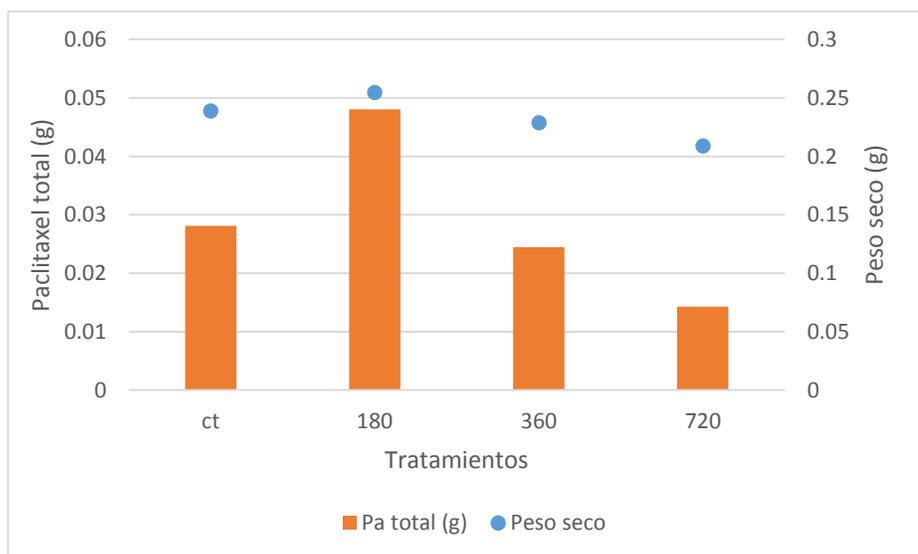


Figura 35. Producción de paclitaxel y peso seco final en los tratamientos con AS

Los tratamientos de elicitación con AS mostraron una mayor cantidad de paclitaxel total en todas las intensidades en comparación con los de MeJa. La cantidad de los controles difiere entre elicitores (fig. 36).

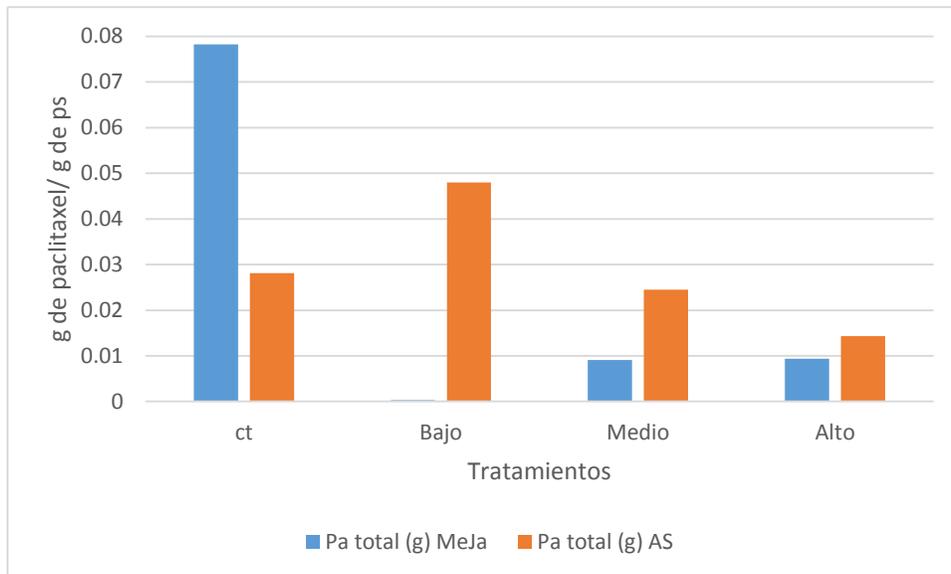


Figura 36. Cantidad de paclitaxel total (g) por tratamiento en los dos elicitores.

7. Discusión

Establecimiento de líneas celulares de *T. globosa*

Los cultivos empleados se seleccionaron considerando los que presentaron una mayor proliferación celular durante el tiempo de mantenimiento que fueron los provenientes de callo en condiciones de oscuridad, a diferencia de los callos provenientes de las acículas en condiciones de fotoperiodo, que presentaron un lento crecimiento. La situación anterior es contraria a lo reportado por Furmanowa y colaboradores (1997) y más recientemente por Martínez (2011), quien menciona que los callos provenientes de acículas fueron más prolíferos bajo las mismas condiciones de incubación.

Los cultivos de callos que se mantuvieron presentaron fuerte oxidación, característica determinada cualitativamente. Para contrarrestar este efecto se agregaron al medio sustancias como PVP que forma complejos con fenoles así como AgNO_3 que tiene como función inhibir la acción del etileno, sin embargo la oxidación de los cultivos de callos es un problema que se ha hecho presente en este y otros estudios

como lo reporta Barradas y colaboradores (2010), quienes obtuvieron pocas líneas celulares debido a la oxidación de los callos de *T. globosa*. En el caso del presente trabajo, este fenómeno se puede atribuir al estímulo excesivo en la división celular, así como al daño mecánico en cada subcultivo, por lo que éstos se llevaron a cabo cada cuatro semanas generando un menor estrés debido al sobre estímulo y por otro lado con una manipulación cuidadosa para evitar el daño excesivo al tejido (fig. 9), de esta manera se favoreció el proceso de aclimatación y con ello se erradicó la oxidación.

Evaluación de crecimiento de cultivos en suspensión de T. globosa

Una vez caracterizado el crecimiento, se observó que el tiempo en el que las células se duplican es menor (1.06 días) en comparación con otros trabajos, pues en un día son capaces de duplicarse alcanzando un tiempo cinco veces menor que el calculado para *Taxus chinensis* en el estudio de Dong y Zhong (2001) con un tiempo de duplicación de 5.77 días (Pérez, 2010).

El rápido crecimiento en las condiciones de cultivo manejadas en el presente estudio, sugiere una aclimatación de las células, la cual fue lenta debido a que logró obtenerse una línea celular después de tres años a partir de la inducción a callo; una vez establecida, se procedió a proliferarla durante un año para obtener los 400 g de callo necesarios para el estudio.

En la cinética de crecimiento que se observó que los cultivos celulares de *T. globosa* completan un ciclo de crecimiento en 14 días, teniendo la fase exponencial al día 5 y la estacionaria al día 8. Con esta información se determinó que el día de elicitación sería el 3 con el fin de generar un estímulo previo y durante la división celular y se cosechó al día 14 ya que después de la fase estacionaria hay una mayor acumulación del metabolitos secundarios.

Elicitación con metil jasmonato y ácido salicílico

En cuanto a la relación peso fresco/peso seco entre los tratamientos de MeJa y AS, se observó que las células elicidadas con MeJa almacenaron una mayor cantidad de agua respecto a las de AS. Debido a que el valor del peso seco es menor en los tratamientos de MeJa se puede relacionar con lo reportado por Yukimune y colaboradores (2000), en donde se menciona que en cultivos celulares *in vitro* de raíces de *Taxus* hay inhibición de la división celular al agregar metil jasmonato.

Se relacionó el peso seco y tratamiento de elicitación (figs. 34 y 35) con el fin de determinar la existencia de estrés indicada por la disminución del peso ya que en esta condición una de las respuestas es el desequilibrio en el crecimiento dando como resultado una disminución en la viabilidad (Lichtenthaler, 1998; Shulaev, 2008). El hecho de que no hay una marcada diferencia de peso seco respecto al tratamiento de elicitación, se atribuye a que no se generó una condición de estrés, por lo que se puede sugerir hacer la elicitación con diferentes tiempos de exposición para determinar en cuánto tiempo de contacto con el elicitor se induce una producción de paclitaxel sin generar el estrés suficiente para llegar a una oxidación y muerte celular.

Si bien, el estrés no se reflejó en la pérdida de peso, se observó por el fenómeno de oxidación que fue mayor en la elicitación con MeJa, lo cual es evidente debido a que este compuesto es considerado una molécula señalizadora de estrés (Avanci, *et. al.*, 2010), a diferencia del AS, que tiene un efecto protector contra el daño oxidativo, además de alterar la síntesis y señalización del etileno (Rangel, *et.al.*, 2010).

Rendimiento de extractos

Se observó un mayor rendimiento en los extractos de MeJa obtenidos con AcOEt, particularmente en los medios nutritivos, sin embargo, el tratamiento control para esta elicitación presentó el rendimiento más alto. Por otro lado, en los extractos metanólicos de ambas elicitaciones se obtuvo un mayor rendimiento con los medios nutritivos, lo que se explica por su alto contenido de compuestos polares. No se distinguió alguna tendencia clara entre la concentración del elicitor respecto a los rendimientos obtenidos, un parámetro que también sugiere que la concentración del elicitor o los tiempos de exposición fueron insuficientes para incrementar los rendimientos de los extractos. Únicamente se observó un ligero aumento del rendimiento de extractos de células conforme aumenta la concentración del elicitor AS. La elicitación con MeJa dio lugar a un mayor rendimiento tanto en células como en medios.

Cromatografía en capa fina

El perfil cromatográfico de los extractos de AcOEt de medios de la elicitación con MeJa, sugiere que el elicitador estimuló la producción y secreción de compuestos en los tratamientos, ya que se observó diferencia en el número de bandas entre el control y tratamiento. Por otra parte, el perfil de los extractos de la elicitación con AS, no presentó diferencias entre el control y los tratamientos, ni entre los extractos de células y medios, sin embargo las bandas relacionadas a paclitaxel están mejor definidas en los extractos de células. Al comparar la cantidad de compuestos observados en las placas, se apreció que es menor en MeJa que en AS, además de que en éstas últimas hay una mayor cantidad de bandas con un Rf muy cercano al del estándar, indican la presencia de compuestos similares al paclitaxel, sugiriendo que el AS induce la producción de una mayor cantidad de compuestos, algunos de ellos relacionados con el paclitaxel.

Por otro lado, los extractos de AcOEt de células presentaron un mayor número de bandas tanto en los tratamientos de MeJa como de AS, respecto a los de medios nutritivos.

En los extractos de células de la elicitación con AS, la intensidad de las bandas aumenta con la concentración del elicitador lo que indica mayor cantidad de compuestos. Respecto a los medios nutritivos, se observó diferencia de secreción de compuestos al agregar el elicitador, ya que en tratamiento control se presentó una menor cantidad de bandas al igual que la concentración más alta del elicitador, lo cual sugiere una relación inversa de la secreción de compuestos relacionada con la concentración del elicitador.

Los extractos de MeJa presentaron menos bandas que los de AS, lo cual indica que la condición del tiempo de exposición y la concentración de AS, generó un mayor estímulo en la producción y secreción de compuestos. En los medios nutritivos, se detectó una menor cantidad de compuestos solamente en los tratamientos de MeJa, a diferencia de los extractos de AS, en donde hubo tanto en medios como en células, una mayor complejidad de los extractos. En el caso de los medios nutritivos, el hecho de encontrar más bandas en los tratamientos de AS, indica que el elicitador da lugar a la secreción de mayor cantidad de compuestos.

Cuantificación de paclitaxel

Una presencia de paclitaxel en los extractos de células y de medios nutritivos, nos indica la acumulación y secreción del compuesto, lo cual concuerda con lo reportado por Srinivasan y colaboradores (1995).

Finalmente, otros autores reportan que el hecho de encontrar paclitaxel en el medio nutritivo es debido a la lisis celular (Wickremesinhe, *et. al.*, 1994) lo cual no se puede sustentar con los resultados de este trabajo, pues al final de la elicitación no se observó una disminución significativa en el peso de las células en los tratamientos que presentaron una mayor secreción de paclitaxel.

Elicitación con MeJa

Tomando en consideración la variación del Rf que mostraron los perfiles cromatográficos de los extractos, se tomó como criterio de identidad solo aquellas bandas que mostraron un espectro de absorción semejante al de paclitaxel, de tal modo que en el caso de la elicitación con MeJa, los únicos extractos que presentaron paclitaxel son los correspondientes a los medios procesados con AcOEt. El MeJa se ha empleado satisfactoriamente para aumentar la producción de metabolitos secundarios en condiciones *in vitro* del género *Taxus*. Se han empleado concentraciones que van desde 60, 100, 120 y hasta 200 μM (Bonfil, 2006; Roberts, *et.al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2013; Wu, *et al.*, 2004; Dong y Zhong., 2001; Naill, *et al.*, 2004). En el presente trabajo las concentraciones empleadas fueron 50, 100 y 150 μM . Se apreció una tendencia de aumento directamente proporcional de la cantidad de paclitaxel respecto a la concentración del elicitador, sin embargo, en ningún caso la cantidad del paclitaxel supera a la del control, con este resultado se puede sugerir que el elicitador, a mayor concentración, genera un mayor estímulo de secreción de paclitaxel (fig. 30). Es posible que la respuesta metabólica se haya dado en otros compuestos que no fueron estudiados en el presente trabajo.

En estudios anteriores, la elicitación con MeJa, resultó favorable a pesar de la pérdida de peso celular (Yukimune, *et.al.*, 2000). En el presente trabajo aunque no se observó una pérdida significativa en la biomasa (fig. 34), es posible que la proporción de metabolitos primarios como secundarios haya sido diferente en los tratamientos con respecto al control.

Elicitación con ácido salicílico

Se identificó paclitaxel en las muestras correspondientes a AcOEt, de células y medios nutritivos, así como en los extractos metanólicos de células. Por lo que es importante realizar la extracción con ambos disolventes, para extraer la mayor cantidad de paclitaxel, de lo contrario, solamente estaríamos obteniendo una porción de éste.

En este tratamiento el paclitaxel se pudo extraer tanto de células como de medios nutritivos, sugiriendo una acumulación del compuesto en las células, lo que no fue observado en el tratamiento con MeJa.

En un estudio realizado por Khosroushahi y colaboradores (2006), en *T. baccata* se incrementó la cantidad de paclitaxel total respecto al control al usar una concentración de 720 μM , sin embargo, el elicitor se agregó el día 25 de cultivo celular y se dejó actuar durante 5 días. En el presente estudio el tratamiento control presenta la mayor cantidad de paclitaxel intra y extracelular, además de que al sumar el paclitaxel de los tres extractos (paclitaxel total), se observa una tendencia inversamente proporcional entre la cantidad de paclitaxel y la concentración del elicitor, en donde el tratamiento de elicitación más baja (180 μM) produjo la mayor cantidad de paclitaxel y la menor pérdida de biomasa (fig. 35).

Comparación de producción de paclitaxel entre elicitores

Los resultados mostraron diferencias importantes entre los dos elicitores, la distribución intra y extracelular del compuesto fue una de ellas. Las tendencias en la síntesis del compuesto fueron en un caso directamente proporcional (MeJa) y en AS inversamente proporcional, lo cual sugiere que la intensidad y duración del estrés (estímulo producido por elicitor) no fueron los adecuados.

Es deseable que para realizar una buena cuantificación de paclitaxel se realice la extracción tanto con AcOEt como con MeOH, a la vez que el medio nutritivo también sea analizado.

La variación observada dentro y entre los tratamientos (fig. 36) sugiere una heterogeneidad de los cultivos celulares aun siendo seleccionados por sus características fenotípicas y de crecimiento celular, por lo que se hace necesario aumentar el tamaño de muestra. Dicha variación de producción de paclitaxel es común entre cultivos, ya que la inducción de una constante división celular puede traer consigo una inestabilidad en la producción de metabolitos secundarios, además de que en el caso de *T.*

globosa, tiende a formar agregados celulares en poco tiempo, lo cual implica que cada agregado se comporte de manera diferente, teniendo en la suspensión celular subpoblaciones que pueden diferir metabólica y morfológicamente y esto a su vez afecta la acumulación y/o secreción del metabolito de interés (Wilson y Roberts, 2012).

Las especies del género *Taxus*, presentan grandes diferencias en la producción de paclitaxel en condiciones naturales y dentro de la especie *T. globosa* se pueden encontrar también, pues se reporta que puede producir de 400 a 500 $\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco de acículas (Van Rozendal, *et. al.*, 2000), no obstante, en cultivo *in vitro* Bringi y colaboradores (1995) la reportan como la especie con el rendimiento más bajo de paclitaxel. En el estudio realizado por Barradas (2010), catalogan su línea celular como “no productora de paclitaxel”, sin embargo, obtienen cantidades considerables del precursor baccatina-III.

8. Conclusiones

- La disminución de la oxidación se obtuvo ampliando el tiempo de subcultivo y disminuyendo el daño en el tejido al manejarlo, con ello se obtuvieron las líneas celulares con alta proliferación celular.
- Se incrementó la velocidad de crecimiento de callos de *T. globosa*, siendo hasta cinco veces mayor que la reportada en otros estudios.
- La diferencia de resultados en la cuantificación de paclitaxel entre controles mostró una heterogeneidad de los cultivos celulares.
- Se detectó paclitaxel tanto en extractos de AcOEt como metanólicos por lo que es necesario realizar la extracción con los dos disolventes.
- La elicitación con MeJa no indujo un aumento en la cantidad de paclitaxel y el AS generó un mayor estímulo en la producción y secreción del metabolito.
- Hay una producción diferencial de compuestos respecto al elicitor adicionado, siendo el elicitor AS, el que dio lugar a mayor cantidad de compuestos a nivel intra y extracelular.

9. Anexos

ANEXO 1

Tabla de soluciones concentradas 100 X del medio B5 (Gamborg, *et.al.*, 1968)

para Tax y Taxliq

Nombre del compuesto	Fórmula	1l (g)
Solución I: NITRATOS		
Nitrato de Potasio	KNO ₃	250
Sulfato de Amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	13.4
Solución II: SULFATOS		
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	25
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	1
	MnSO ₄ .H ₂ O	1.31
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2
Sulfato de cobre *	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025*
Solución III: HALÓGENOS		
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	15
	CaCl ₂ .H ₂ O	13.156
	CaCl ₂	11.32
Yoduro de Potasio	KI	0.075
Cloruro de Cobalto *	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025*
Solución IV: FOSFATO, ÁCIDO BÓRICO, MOLIBDATO		
Fosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	15
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	13.247
	NaH ₂ PO ₄	11.51
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.3
Molibdato de sodio*	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025*
Solución V: QUELANTES		
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.11
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂	2.55
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	2.82

*De una solución concentrada de 0.025 g en 100 ml (de CuSO₄ o de CoCl₂ o Na₂MoO₄ • 2H₂O) tomar una alícuota de:

- 0.5 ml para preparar 50 ml de solución madre 100x
- 1 ml para preparar 100 ml de solución madre 100x
- 2.5 ml para preparar 250 ml de solución madre 100x

ANEXO 2

Reactivo de Lieberman-Burchard

5 ml de ácido sulfúrico y 5 ml de anhídrido acético se añaden a 50 ml de etanol absoluto en un baño de hielo. Se aplica el revelador rociando de manera uniforme toda la placa cromatográfica.

Posteriormente se calienta a 100 °C durante 5 minutos.

ANEXO 3

Disolventes empleados en la cromatografía de los extractos

Extracto	Disolventes
MeJa. Células. AcOEt	Acetato de etilo: Metanol (1:1)
MeJA. Medio. AcOEt	Acetato de etilo: Metanol (1:1)
MeJa. Células. MeOH	Metanol
MeJa. Medio. MeOH	Metanol
AS. Células. AcOEt	Cloroformo : Metanol (1:1)
AS. Medio. AcOEt	Etanol
AS. Células. MeOH	Etanol
AS. Medio MeOH	Metanol

10. Referencias bibliográficas

- Amini S.A., L. Shabani, L. Afghani, Z. Jalalpour, M. Sharifi-Tehrani, 2014, "Squalestatin induced production of taxol and baccatin in cell suspension culture of yew (*Taxus baccata* L.), en *Turkish Journal of Biology*, 38: 528-536.
- Angelova Z., Georgiev S., Roos W., 2006, "Elicitation of plants" en *Biotechnol. & Biotechnol.*, pp. 72-83
- Arias M., 2009, *Establecimiento de cultivos de células en suspensión de Thevetia peruviana y elicitación de metabolitos secundarios tipo glicósidos cardiotónicos*", Medellín, Tesis de Doctorado en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, 117 p.
- Avanci N., Luche D., Goldman G., Goldman M., 2010, "Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction" en *Genetics and Molecular Research*, 9(1) : 484-505.
- Barradas D., Hayward P., Mata M., Palmeros B., Platas O., Velásquez R., 2010, "*Taxus globosa* S. cell lines: Initiation, selection and characterization in terms of growth, and of baccatin III and paclitaxel production" en *Biocell*, 34 (1) : 1-6
- Barrales C., H. 2013, "Producción de taxoides en cultivos in vitro de callos y células elicidadas de *Taxus globosa*, Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados, 118 pp.
- Barrales C., H. y Marco F. Ramírez S., 2013, "Una revisión sobre la producción de taxoides anticancerígenos en cultivos *in vitro* de callos y células de *Taxus spp*", *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15(2): 167-177.
- Benítez I., 2009, "Análisis del contenido de taxol y otros taxanos y su relación con la expresión del gen *ts* en cultivos in vitro de *Taxus globosa* Schltdl", Tesis de Maestría, IPN, 87 p.
- Blanco E., Vasco F., Abella I., Cortés S., 2008, "Tejo y cultura: de la tradición etnobotánica a la farmacología científica" en *II Jornades sobre el teix a la Mediterrània Occidental*. Tomado de: https://issuu.com/ichn_garrotxa/docs/documents_1_ivjornadesteix_blanco_et_al_71_89.
- Bhojwani S. y Kumar Dantu, 2013, *Plant Tissue Culture: An Introductory Text.*, Springer, 309 pp.

- Bonfil M., O. Exposito, E. Moyano, R.M. Cusidó, J. Palazon, M.T. Piñol. 2006. "Manipulation by culture mixing and elicitation of paclitaxel and baccatin III production in *Taxus baccata* suspension cultures" en *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 42: 422-426
- Bringi V., Kadcade P., Prince C., Schubmehl B., Kane E., Roach B., 1995, "Enhances production of taxol and taxane by cell cultures of *Taxus* species", USA, Patente No. 5 407 816, Phyton Catalytic, Inc.
- Brooks, C. y Watson, D., 1991, "Terpenoid phytoalexins" en *Nat. Prod. Rep.*, 8 : 367-389 pp.
- Brown D., "Preclinical and clinical studies of the taxanes" en *The Genus Taxus*, Londres, pp.387-435.
- Chávez L., 2012, "Apuntes sobre algunos reguladores de crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico" en
- Choi H.K., Kim S.I., Song J.Y., Son J.S., Hong S.S, Durzan D.J. y Lee H.J., 2001, "Localization of paclitaxel suspension culture of *Taxus chinensis*", *Microbiol. Biotechnol.*, 11(3): 458-462.
- Croom E., 1995, "*Taxus* for taxol and taxoids", en *Science and applications*, 37-70 pp.
- Cusidó, R. M., Palazón, J., Bonfil, M., Exposito, O., Moyano, E., y Piñol M. T., 2007, "Source of isopentenyl diphosphate for taxol and baccatin III biosynthesis in cell cultures of *Taxus baccata*" *Biochemical Engineering Journal*, 33: 159–167
- Contreras Medina, R., I. Luna Vega, C. Ríos Muñoz., 2010, "Distribución de *Taxus globosa* (Taxaceae): Modelos ecológicos de nicho, efectos del cambio de uso de suelo y conservación" en *Revista Chilena de Historia Natural*, 83: 421-433.
- Davies, P., J., 2010, *Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action.* 3er.ed., Springer, USA, 802 p.
- DiCosmo, F. y Misawa, M., 1985, "Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures", en *Trend Biotechnol.* 3: 318-322.
- Dong, Hao-Di & Jian-Jiang Zhong, 2001, "Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrosa feed" *Biochemical Engineering Journal*, 8: 145-150.

- Evans D., Coleman J., Kearns A., 2003, *Plant Cell Culture*, Garland Science, 194 pp.
- Fett A., Zhang W., Di Cosmo F., 1994, "Kinetics of taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidate*" en *Biotechnology and Bioengineer*, 44: 205-210.
- Furmanowa M., Glowniak K., Sykłowska-Baranek K., Zgórk G., Józefczyk A., 1997, "Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus of *Taxus x media* var. *Hatfieldii*" en *Plant cell, tissue and organ culture*, 49 : 75-79.
- Gamborg O., Miller R., Ojima K., 1968, "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells" en *Exp. Cell Reasearch*, 50:151-158.
- García M., Cantú C., Estrada E., Pando M. y Moreno A., 2012, "Distribución actual y potencial de *Taxus globosa* (Taxaceae) en México" en *J.Bot.Res.Inst.*, 6(2):587-598.
- Gaspar T., Franck, T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J., Dommes J., 2002, "Concepts in plant stress physiology. Applications to plant tissue cultures" en *Plant Growth Regul.* 37: 263-285.
- George E. F. y Geert-Jan De Klerk, 2008, "The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients" en *Plant propagation by tissue culture*, 3ª ed., Vol. 1, Springer, 65-113.
- Gundlach, H., Müller M., Kutchan T., Zenk M., 1992, "Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures" en *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (6):2389-2393.
- Halliwell B., 2006, "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life", en *Plant Physiology*, 141:312-322.
- Hartmann T., 2007, "From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism" en *Phytochemistry*, 68 : 2831-2846
- Ketchum R., y Gibson D., 1996, "Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*" en *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46:9-16.
- Khosroushahi, A.Y., M. Valizadeh, A. Ghasempour, M. Khosrowshahli. 2006. "Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*" en *Cell Biology International*, 30: 262-269.

- Klessing D., Durner J., Noad R., Navarre D., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H., 2000, "Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense" en *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 97(16):8849-8855.
- Kranner I., Minibayeva F., Beckett R., Seal C., 2010, "What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science", en *New Phytol.*, 188 (3): 655-673.
- Lichtenthaler H., 1998, "The stress concept in plants: an introduction" en *Annals New York Academy of Sciences*, 851 : 187-198.
- Llorente J., y S. Ocegueda. 2008. "Estado del conocimiento de la biota", en *Capital Natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 283-322.
- Luna I., 2003, *Taxus globosa*. Taxones del bosque mesófilo de montaña de la Sierra Madre Oriental incluidos en la norma oficial mexicana. Herbario FCME, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. Bases de datos SNIB-CONABIO.
- Madriz K., 2002, "Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno" en *Manejo Integrado de plagas*, Costa Rica, No. 63, pp. 22-32.
- Martínez G., Mónica, 2011, *Producción in vitro de taxanos de Taxus globosa Schlecht bajo diferentes condiciones de cultivo*, Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, 74 p.
- McGuire, W.P., Rowinsky, E.K., Rosenshein, N.B., Grumbine, F.C., Ettinger, D.S. & Armstrong, D.K., 1989, "Taxol: a unique antineoplastic agent significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasmas", *Ann. Intern. Med.*, 111: 273-279.
- Merino C, L., 2004, *Usos tradicionales de los árboles en el occidente de Asturias*, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 62 p.
- Mirjalili, N. y James C. Linden, 1996, "Methyl jasmonate induced production of taxol in suspensión cultures of *Taxus cuspidata*: Ethylene interaction and induction models" en *Biotechnol. Prog.* 12 : 110-118.
- Mittler R., 2002, "Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance", en *Trends. Plant. Sci.*, 7:405-410

- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., 2004, "Reactive oxygen gene network of plants" en *Trends. Plant. Sci.*, 11:15-19
- Naill M. y Susan Roberts, 2004, "Cell Cycle Analysis of *Taxus* Suspension Cultures at the Single Cell Level as an Indicator of Culture Heterogeneity" en *Biotechnology and Bioengineering*, 90 (4): 491-500.
- Neuman K., Aswani Kumar y Jafargholi Imani, 2009, *Plant cell and tissue culture-A tool in Biotechnology*, Springer, 333 p.
- Nomila M., Nimal C., Kumar M., Agastian P., 2012, "Taxol production by endophytic *Fusarium solani* LCPANCF01 from *Tylophora indica*", *Journal of Academia and Industrial Research*, 1:281-285.
- Ocegueda S., Moreno E. y P. Koleff, 2005, "Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica", en *Biodiversitas*, CONABIO, 62: 12-15
- OMS, 2014, "Informe Mundial sobre el Cáncer" Tomado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Pérez B., J. Alejandro, 2010, *Evaluación de la producción de fitoquímicas a partir de cultivo en de células en suspensión de Nerium oleander*, Tesis de maestría, Unniversidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Medellín, 75 p.
- Rangel G., Castro E., Beltrán E., Reyes H. y E. García., 2010, "El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas" en *Biológicas*, 12 (2) : 90-95.
- Rezaei,A., F. Ghanati, M.A. Dehaghi. 2011. "Stimulation of taxol production by combined salicylic acid elicitation and sonication in *Taxus baccata* cell culture" en International Conference on Life Science and Technology. 3: 193-197 from *Taxus canadensis* crll suspension cultures utilizing cell wall digesting enzymes" en *Plant Cell Report*, 21: 1217 -1220.
- Roberts S., Naill M., Gibson D., Shuler M., 2003, "A simple method for enhancing paclitaxel release from *Taxus Canadensis* cell suspension cultures utilizing cell wall digesting enzymes" en *Plant Cell Rep.* 21:1217-1220.
- Schiff P.B., Fant,J., & Horwitz, S.B. 1979, "Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol", *Nature*, 277: 665 – 667.
- Senthilkumar N., Murugesan S., Mohan V., Muthumary J., 2013, "Taxol producing fungal endophyte, *Calletotrichum gleosporides* (Penz.) from *Tectona grandis* L." en *Biotica* 7: 8-15.

- Shulaev V., Cortes D., Miller G., Mittler R., 2008, "Metabolomics for plant stress response" en *Physiologia Plantarum*, 132 ; 199-208
- Soto M., López J., Vargas J., Muñoz L., San Miguel R., 2011, "Estado de conservación de *Taxus globosa* en México" en *S.J. Rural Development*, 2 : 61-68.
- Srinivasan K. y Muthumary J., 2009, "Taxol production from *Pestalopsis* sp., an endophytic fungus isolated from *Catharanthus roseus*" en *Journal of Ecobiotechnology*, 1 (1) : 28-31.
- Srivastava S., Srivastava A., 2007, "Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites" en *Critical Reviews in Biotechnology*, 27: 29-43.
- SEMARNAT, 2010, Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-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. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación (México), 77p.
- Tang K., Zhang L., Chen J., Xiao Y., Chen W., Sun X., "Secondary Products" en *Plant Cell Culture: Essential Methods.*, John Wiley & Sons, 358 pp.
- Taiz L., E. Zeiger, 2010, *Plant Physiology*, Sinauer Associates, USA, 5° ed., 623 p.
- Van Rozendaal E.L.M., Lelyveld G.P., Van Beek T.A., 2000, "Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related taxoids" *Phytochemistry*, 53:383-389.
- Villaseñor J.L., 2004, "Los géneros de plantas vasculares de la flora de México", en *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75 : 105-135.
- Wang X., Pan L., Mao N., Sun L., Qin X. Yin J., 2013, "Cell cycle synchronization reverses Taxol resistance of human ovarian cancer cell lines" en *Cancer Cell International*, 13:77-84.
- Wani M., Taylor H., Wall M., Coggon P., McPhail A., 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: 2325-2327.
- Wickermensinhe E.R.M y R. Arteca, 1994, "Taxus cell suspension cultures: optimizing growth and production of taxol" en *Journal of Plant Physiology*, 44 : 183-188.

- Wilson S. y Susan C. Roberts, 2012, "Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules", en *Plant Biotechnology Journal*, 10: 249-268.
- Wu J., y L. Lin, 2003, "Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and *in situ* solvent extraction" en *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62 (2-3): 151-155.
- Xiong Z., Yang Y., Zhao N., Wang Y., 2013, "Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojapyew, *Taxus x media*", *Microbiology*, 13 : 71-80
- Yuan, Y., Chun Li, Zong-Ding Hu, Jin- Chuan Wu., 2002, "A double oxidative burst for taxol production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *Mairei* induced by oligosaccharide from *Fusarium oxysprum*" en *Enzyme and Microbial Technology*, 30 : 774-778.
- Yuan J, Jian-Nan B, Bing Y, Xu-Dong Z., 2006, "Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol", *Chinese J Biotechnol*, 22:1-6.
- Yukimune Y., Hara Y., Nomura E., Seto H., Yoshida S., 2000, "The configuration of methyl jasmonate affects paclitaxel and baccatin III production in *Taxus* cells" en *Phytochemistry*, 54(1): 13-17.
- Zhang, C.H., X.G Mei, L. Liu, L.J. Yu, 2000, "Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*" en *Biotechnology Letters*, 22 (19): 1561-1564
- Zhao J., Davis L., Verpoorte C., 2005, "Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites" en *Biotechnol. Adv.*, 23:283-333.
- Zhong, J., 2002, "Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes", *Journal of Bioscience and bioengineering*, 94 (6): 591-599.