



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Producción *in vitro* de taxanos de  
*Taxus globosa* Schlecht bajo diferentes  
condiciones de cultivo**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MÓNICA MARTÍNEZ GARCÍA**



**DIRECTORA DE TESIS:  
M. en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores  
2011**



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.

## DATOS DEL JURADO

---

### 1. Datos del alumno

Martínez  
García  
Mónica  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
301086905

### 2. Datos del tutor

M. en C.  
María Teresa de Jesús  
Olivera  
Flores

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Josefina  
Herrera  
Santoyo

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Víctor Manuel  
Chávez  
Ávila

### 5. Datos del sinodal 3

Dra.  
Irma Ofelia  
Bernal  
Lugo

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
Octavio  
González  
Caballero

### 7. Datos del trabajo escrito

Producción *in vitro* de taxanos de *Taxus globosa* Schlecht bajo diferentes condiciones de cultivo  
74 pp.  
2011

*A mi hermosa familia: Erasmo, Isabel, Fátima, Adrián, Botones y Pelusita, ¡los amo!*

*A todos aquellos que con cariño han compartido parte de su vida  
conmigo, a mis queridos amigos.*

*Para cada uno, extiendo mi mas profundo agradecimiento por los buenos momentos que  
hemos compartido, lo que me han enseñado y lo mucho que me han ayudado en los períodos difíciles.*

## *AGRADECIMIENTOS*

---

**Al proyecto con clave CONACYT-CONAFOR-2005-14739, por el financiamiento otorgado**

A mi asesora, Mayte, a todos los miembros del jurado, al Dr. José Fausto Rivero Cruz, al QFB. Rodrigo Reyna y a la Biol. María de Jesús Jiménez Villalobos por su orientación y apoyo durante todo el desarrollo experimental y el trabajo escrito.

A la UNAM y a su Facultad de Ciencias, por la formación de calidad que me brindaron.

## TABLA DE CONTENIDOS

---

	Página
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>SIGLAS</b>	<b>2</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
<b>1. <i>Taxus globosa</i>.</b>	<b>6</b>
1.1. <i>T. globosa</i> : descripción botánica.	6
1.2. <i>T. globosa</i> : distribución y conflictos taxonómicos.	8
1.3. <i>T. globosa</i> como parte de la riqueza mexicana: Estatus y problemática.	10
<b>2. Cultivo de tejidos vegetales (CTV).</b>	<b>11</b>
2.1. Generalidades y aplicaciones del CTV.	11
2.2. Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).	13
2.3. El CTV como alternativa para la obtención de metabolitos secundarios.	16
2.3.1. Inducción de callo y cultivos de células en suspensión.	20
2.3.2. Cinética de crecimiento.	21
<b>3. Metabolismo secundario.</b>	<b>23</b>
3.1. Generalidades de los metabolitos secundarios.	23
3.2. Clasificación de los metabolitos secundarios.	25
<b>4. Paclitaxel (Taxol®).</b>	<b>26</b>
4.1. Características químicas del paclitaxel.	26
4.2. Importancia farmacéutica y mecanismo de acción del paclitaxel.	29
4.3. Producción de paclitaxel a partir de <i>Taxus sp.</i>	31
4.4. Producción de paclitaxel en <i>T. globosa</i> .	34
<b>5. Antecedentes en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Taxus sp.</i></b>	<b>35</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>38</b>
<b>OBJETIVOS: General y particulares.</b>	<b>39</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>Etapa I. Obtención del cultivo celular</b>	<b>41</b>
I.a. Inducción, proliferación y mantenimiento de callo de <i>T. globosa</i> .	41
I.b. Detección de la presencia de etileno en los cultivos.	44
I.c. Establecimiento de cultivos celulares en suspensión.	45

---

I.d. Cinética de crecimiento.	46
<b>Etapa II. Elicitación y análisis de taxanos</b>	<b>47</b>
I.a. Elicitación de los cultivos por adición de Metil Jasmonato (MeJA).	47
I.b. Extracción y análisis de paclitaxel por CCF y HPLC.	47
<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<b>Etapa I. Obtención del cultivo celular</b>	<b>49</b>
I.a. Inducción, proliferación y mantenimiento de callo de <i>T. globosa</i> .	49
I.b. Detección de la presencia de etileno en los cultivos.	52
I.c. Establecimiento de cultivos celulares en suspensión.	53
I.d. Cinética de crecimiento de los cultivos en suspensión.	53
<b>Etapa II. Elicitación y análisis de taxanos</b>	<b>54</b>
I.b. Extracción y análisis de paclitaxel por CCF y HPLC	54
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>

## ABREVIATURAS

---

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	N-isopentenilaminopurina
ABA	Ácido abscísico
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AdoMet	5-adenosilmetionina
AIA (IAA)	Ácido indol-3-acético
AIB (IBA)	Ácido indol-3-butírico
ANA (NAA)	Ácido 1-naftalenacético
AOA	Ácido amino-oxiacético
ARN	Ácido ribonucleico
AVG	Aminoetoxi-vinil-glicina
BAP (BA)	6-bencilaminopurina (6-benciladenina)
CCC	Cloruro de clorocolina
CCF / TLC	Cromatografía en capa fina / Thin layer chromatography
CLAR / HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución / High performance liquid chromatography
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
EDTA	Ácido etilendiamina tetra-ácetico
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico 3
GTP	Trifosfato de guanosina
Kinetina	N-(2-furanilmetil)-1H-purina-6-amina; 6-furfurilamonipurina
MeJA	Metil Jasmonato
MeOH	Metanol
PAM's	Proteínas asociadas a microtúbulos
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PVP	Polivinilpirrolidona
RCV	Regulador de crecimiento vegetal
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida
UV	Ultra Violeta
B5	Medio de cultivo de Gamborg <i>et al.</i> , 1968.
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog, 1962.
SH	Medio de cultivo de Schenk y Hildebrandt, 1968.



## SIGLAS

---

CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad.
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
CONAFOR	Comisión Nacional Forestal.
EM / MA	Evaluación de los Ecosistemas del Milenio / Millenium Ecosystem Assessment).
FAO	Organización para la agricultura y alimentación (Food and Agriculture Organization).
FDA	Administración de alimentos y fármacos (Food and Drug Administration).
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
OMS	Organización Mundial de la Salud.

Los árboles del género *Taxus* son sumamente apreciados por la producción de Paclitaxel (Taxol®), un taxano de gran relevancia farmacéutica por sus propiedades anticancerígenas, sin embargo, su extracción es costosa económica y ecológicamente debido a su bajo rendimiento, a pesar de que se ha trabajado intensamente en alternativas que aumenten su producción en varias especies del género, el “tejo” mexicano (*T. globosa*) es el menos estudiado y poco aprovechado. Estudios previos (Soto *et al.*, 2000; Shemluck, 2003; Barrios *et al.*, 2009) han demostrado que esta especie, a diferencia de otros “tejos”, posee un mayor potencial para la producción de paclitaxel.

Establecer medidas tendientes no sólo a su explotación farmacéutica sino también a su conservación es una necesidad real, pues es una especie sujeta a Protección Especial por NOM-059-ECOL-2001.

En este trabajo se exploró su cultivo *in vitro* como una alternativa para la obtención del metabolito secundario u otros taxanos. Se cultivaron tallos y acículas en medio B5 enriquecido con vitaminas, aminoácidos y adicionado con fitorreguladores. Se consiguió el establecimiento de cultivos asépticos de callo a partir de ambos explantes bajo diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  (1, 2 y 3  $\text{mg L}^{-1}$ ) y condiciones de luz (fotoperiodo y oscuridad), así como cultivos celulares en suspensión. Con el tratamiento de 2  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  se logró disminuir oxidación y obtener mayor proliferación de biomasa.

En los cultivos en suspensión se estimuló la producción del metabolito secundario elicitándolos con metil jasmonato (100  $\mu\text{M}$ ), el análisis por HPLC demostró una mayor producción del metabolito con respecto a los cultivos no elicitados.

A lo largo de la historia, la humanidad ha empleado los productos naturales para el tratamiento de diversas enfermedades, tal es el caso del ácido rosmarinico utilizado como anti-inflamatorio al igual que la galangina, la quinidina con propiedades antiarrítmicas, la vincristina, la vinblastina o el paclitaxel con actividad antitumoral, por mencionar algunos ejemplos.

Un alto porcentaje de los medicamentos prescritos son derivados de productos naturales, en especial de origen vegetal, muchos de estos productos son difíciles o hasta ahora imposibles de sintetizar en el laboratorio por la complejidad de su molécula, se agrupan bajo el nombre de metabolitos secundarios y están presentes en todas las plantas superiores, sin embargo, se producen en bajas concentraciones, provocando que la recolección excesiva de estas plantas conduzca a la disminución o extinción de sus poblaciones, de tal manera que la extracción de dichos compuestos resulta costosa tanto en términos económicos como ecológicos.

La aplicación de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales ofrece la posibilidad de producir estas sustancias bajo condiciones *in vitro* para evitar la sobreexplotación de las especies productoras y ofrecer un mejor control de la producción. No obstante, pocos son los casos donde esta alternativa ha resultado exitosa, pues en la práctica existen diversas problemáticas que limitan el rendimiento, por ejemplo, la baja concentración del metabolito en los cultivos que en algunos casos llega incluso a ser menor que la obtenida en plantas completas, dificultades de tipo técnico en el manejo y cultivo del material vegetal, en la extracción y purificación de los productos obtenidos o la falta de conocimientos sobre los mecanismos bioquímicos o genéticos involucrados.

Los estudios que puedan ayudar a resolver algunos de estos problemas sin duda redundarán en nuevos avances. Esta tesis, como parte de un proyecto<sup>(\*)</sup> mayor, buscó contribuir con la solución de algunos problemas técnicos como la oxidación y la lenta proliferación celular del cultivo *in vitro* de *Taxus globosa* (figura 1), una especie vegetal nativa de México que ha sido poco estudiada y por tanto poco aprovechada como productora de un compuesto anticancerígeno de pulmón, mama y ovario, con gran relevancia en el área farmacéutica por sus propiedades

---

<sup>(\*)</sup> Proyecto con clave CONACYT-CONAFOR-2005-14739. A cargo de la Dra. Hilda Susana Azpiroz Rivero, Dra. Teresita del N. J. Marín H., Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo, M. en C. María Teresa Olivera Flores, M. en C. M. del Pilar De la Garza López de Lara, Dr. Marcos Soto Hernández, Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, Biól. Francisco Reséndiz Martínez, Biól. Lilia Patricia Olvera Coronel y Biól. Felipe Nepamuseno Martínez, así como todos los tesisistas involucrados en ello dentro de las diversas instituciones y líneas de investigación.

---

antineoplásicas (Wani *et al.*,1971; Arbuck y Blaylock, 1995) conocido como paclitaxel (Taxol®), aprobado por la FDA en 1992.

Explorar el cultivo *in vitro* de esta especie permitió investigar su rendimiento en la producción de paclitaxel bajo estas condiciones, tal como se ha hecho con diferentes especies del mismo género. Pero además, invita a considerar su micropropagación como una perspectiva interesante ya que a pesar de tener una amplia distribución existe una grave escasez de individuos, por lo que se encuentra en la categoría de protección especial (Pr) de la NOM-059-ECOL-2001.



**Figura 1.** *Taxus globosa* Schlecht (Taxaceae)

**1. *Taxus globosa*.**

En términos generales, *T. globosa* es una gimnosperma descrita para el género *Taxus* (tabla 1) de la familia Taxaceae, es nativa de México y posee un elevado potencial en la producción de paclitaxel, un anticancerígeno de elevada demanda mundial.

**Tabla 1.** El género *Taxus* (Rudolf, 1974 y Rushforth, 1987).

<b>Especies y Sinonimia(s)</b>	<b>Nombre Común</b>	<b>Distribución</b>
<b><i>T. baccata</i> L.</b> <i>T. baccata</i> ssp. <i>eubaccata</i> Pilger.	Tejo inglés Tejo europeo Tejo común	Europa, Norte de Irán y los Himalayas.
<b><i>T. brevifolia</i> Nutt.</b> <i>T. baccata</i> ssp. <i>brevifolia</i> Pilger.	Tejo del Pacífico	Sur y SE de Alaska, Norte de California y Centro de Nevada; Este de la costa Oregon y Washigton al Oeste de Montana.
<b><i>T. canadensis</i> Marsh.</b> <i>T. baccata</i> ssp. <i>canadensis</i> Pilger	Tejo canadiense	Este de Canadá, Sur de Virginia y Tennessee
<b><i>T. chinensis</i> (Pilg.) Rehder</b> <i>T. celebica</i> (Warburg) Li. <i>T. mairei</i> S.Y. Hu ex Liu. <i>T. yunnanensis</i> Cheng & L.K.Fu.	Tejo Chino Tejo Mairei Tejo Yunnan	Centro y Oeste de China
<b><i>T. cuspidata</i> Sieb. &amp; Zucc.</b> <i>T. baccata</i> ssp. <i>cuspidata</i> Pilger.	Tejo japonés	Japón y este de China
<b><i>T. floridana</i> Nutt. ex Chapman</b> <i>T. baccata</i> ssp. <i>floridana</i> Pilger.	Tejo de florida	Norte de Florida
<b><i>T. globosa</i> Schtdl.</b> <i>T. baccata</i> ssp. <i>globosa</i> Pilger.	Tejo mexicano Tejo hondureño Tejo guatemalteco	Desde el Noroeste de México hasta Guatemala y El Salvador
<b><i>T. wallichiana</i> Zucc.</b> <i>T. baccata</i> ssp. <i>wallichiana</i> Pilger.	Tejo del Himalaya	Montañas del Himalaya, Este de Afganistán, norte de la India, Este del Tibet, Burma y Filipinas.
<b><i>Taxus x media</i></b>	-----	( <i>T. baccata</i> x <i>T. cuspidata</i> )
<b><i>Taxus x hunnewelliana</i></b>	-----	( <i>T. canadensis</i> x <i>T. cuspidata</i> )

**1.1. *T. globosa*: descripción botánica.**

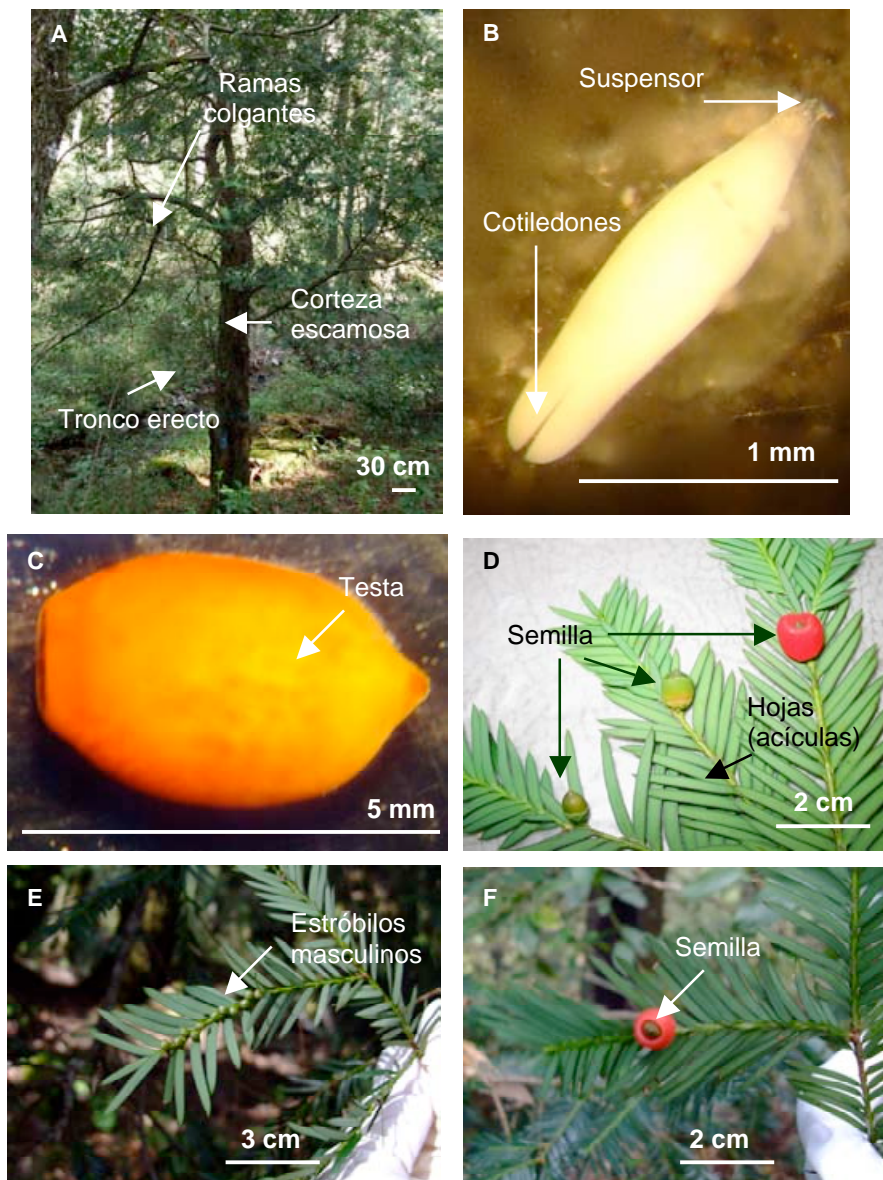
Contreras y Luna (2001) describen a esta especie a partir de una modificación de Zamudio (1992), como un árbol bajo o arbusto (figura 2-A), perennifolio, dioico, de 6 a 18 m de alto; tronco erecto de 30 a 50 cm de diámetro, muy ramificado, con las ramas colgantes, formando una copa redondeada o extendida; corteza escamosa

---

---

de color café claro, que se desprende en fragmentos cuadrados o rectangulares; hojas (figura 2-D) distribuidas en espiral, las cuales posteriormente se disponen en forma dística o subdística por la torsión del pecíolo, aplanadas, lineares a linearlanceoladas, ligeramente falcadas, de 2 a 3.7 cm de largo y de 2 a 3 mm de ancho, ápice agudo, acuminado, base angosta, pecíolo corto, márgenes ligeramente involutos, una sola vena media engrosada, verde oscuras en el haz, más claras en el envés, con hileras de estomas en el envés. Estróbilos masculinos axilares (figura 2-E), ubicados en la parte inferior de la ramas, solitarios o rara vez en espigas compactas de 2 a 4, con un pedúnculo corto, con 4 a 5 brácteas membranosas en la base del estróbilo, imbricadas, amarillentas; estróbilos formados por 7 a 14 conjuntos de sacos polínicos con filamentos cortos, que surgen en el ápice del pedúnculo; microsporófilas peltadas con 4 a 7 sacos polínicos, los cuales presentan dehiscencia longitudinal y tejido conectivo uniendo los sacos. Estróbilo femenino axilar, formado por varias escamas estériles y una escama ovulífera terminal, con un óvulo solitario erecto; semillas (figuras 2-C, 2-D y 2-F) sin ala, ovoides u oval-ovoides de 5 a 7 mm de largo por 4 mm de ancho, de color café, con el ápice apiculado, cubiertas parcialmente por un arilo carnoso de color rojo. Embrión (figura 2-B) con dos cotiledones (Zamudio,1992).

Es una especie longeva al igual que todas las pertenecientes al género *Taxus*, algunas pueden vivir hasta 1500 años y su crecimiento es lento pues alcanza la edad adulta hasta los 18 años (Zavala, 2002). En cuanto a su reproducción, en el caso del tejo mexicano, se ha observado polinización abundante en febrero y marzo y la fructificación ocurre de mayo a agosto en algunas localidades del norte del país o de julio a noviembre en otras del centro (Zavala *et al.*, 2001). En Hidalgo, se han observado abundantes semillas entre septiembre y noviembre (Zavala *et al.*, 2001), las cuales pueden tener una viabilidad de 5 a 6 años si son conservadas a bajas temperaturas, pues de acuerdo a sus características son clasificadas como ortodoxas (Vance y Rudolf, FAO), presentan un letargo embrionario causado por el ABA (Zavala *et al.* 2001; Nicholson y Munn, 2003), retardando su germinación de 1.5 a 2 años (Chee, 1995) en condiciones naturales, por lo que se requieren pretratamientos para inducirla y romper la dormancia, los más señalados en la bibliografía son mediante AG<sub>4</sub> y AG<sub>7</sub> o estratificación con bajas temperaturas además de intensos lavados con agua, pues dicho ácido se libera por lixiviación (Zavala *et al.*, 2001).



**Figura 2.** *Taxus globosa*: A) Árbol masculino en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo; B) Embrión cigótico; C) Semilla despojada del arilo; D) Hojas, vistas por el envés y semilla en diferentes estados de desarrollo; E) Estróbilos masculinos; F) Semilla con arilo rojo.

### 1.2. *T. globosa*: distribución y conflictos taxonómicos.

La distribución de *T. globosa* en nuestro país es en los estados de Hidalgo, Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro y Nuevo León, pero también se tienen registros de ella en Guatemala, Honduras y el sur de El Salvador, habitando preferentemente en bosque templado y bosque mesófilo de

---

---

montaña, en un intervalo altitudinal entre 1000 y 2950 msnm (Contreras y Luna, 2001). Aunque estos árboles son llamados comúnmente “tejos”, la especie mexicana recibe también otros nombres, según la región donde se distribuya se le conoce como granadillo, romerillo, palmira o tlatscal (Zamudio, 1992; Zavala *et al.*, 2001).

Su clasificación taxonómica (tabla 2) presenta dificultades y desacuerdos, pues la posición evolutiva de la familia de estos árboles es muy controversial, algunos taxónomos consideran que Taxaceae no debería ser clasificada dentro de las coníferas sino en una nueva división, por su ausencia de conos, contrario al caso de la mayoría de las coníferas, mientras que otros autores no consideran esto como una diferencia fundamental del resto de la coníferas, excepto en que poseen el cono más reducido y un óvulo solitario (Chaw *et al.*, 1993). Para contribuir a resolver dicha controversia, un grupo de investigadores, Shu-Miaw Chaw, Huei Long, Bin-Shin Wang, Andrey Zharkikh y Wen-Hsiung Li, de China y Estados Unidos, en 1993 publicaron su trabajo en el cual analizaron secuencias de genes de ARNr a partir de gimnospermas representativas: *Taxus mairei* (Taxaceae), *Podocarpus nakaii* (Podocarpaceae), *Pinus luchuensis* (Pinaceae) y *Ginkgo biloba* (Ginkgoales). Su análisis filogenético indica que *Taxus*, *Pinus* y *Podocarpus* forman un grupo monofilético con la exclusión de *Ginkgo*, además de que *Taxus* está más relacionada con *Pinus* que *Podocarpus*. De aquí que concluyen que Taxaceae puede ser clasificada dentro de las Coníferas, considerando la semilla uniovulada de Taxaceae como un carácter primitivo.

Otro conflicto es el número de géneros agrupados en ésta, varía según el autor, pueden ser cinco: *Taxus*, *Austrotaxus*, *Pseudotaxus*, *Torreya* y *Amentotaxus* (Zamudio, 1992; Chaw *et al.*, 1993), sólo los primeros cuatro (Chaw *et al.*, 1993) o únicamente dos, *Torreya* y *Taxus*.

A su vez, *Taxus* L. es un género que agrupa entre 7 y 12 especies (Zavala *et al.*, 2001) o 7-10 (Zamudio, 1992), todas localizadas en el Hemisferio Norte (tabla 1). Sus problemas taxonómicos a nivel específico se deben a que todas las especies de *Taxus* son morfológicamente semejantes (Zavala *et al.*, 2001). Esto ha provocado el uso de la distribución geográfica como principal característica distintiva (Zavala *et al.*, 2001; Da Cheng *et al.*, 2008).



---

---

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Taxus globosa* (Luna, 2003)

Reino	Plantae
División	Coniferophyta
Clase	Taxopsida
Orden	Taxales
Familia	Taxaceae
Género	<i>Taxus</i>
Especie	<i>T. globosa</i> Schlecht, 1838

### 1.3. *T. globosa* como parte de la riqueza mexicana: Estatus y problemática.

México está clasificado dentro de los primeros cinco países con mayor megadiversidad a nivel mundial junto con Brasil, Indonesia, Colombia y Australia, albergando más del 60% de la diversidad biológica total del planeta (Mittermeier y Robles, 1997). Las causas principalmente son su topografía, la variedad de climas y una compleja historia, tanto geológica y biológica como cultural, factores que han contribuido a formar un mosaico de condiciones ambientales y microambientales que promueven una gran variedad de hábitats y de formas de vida (Sarukhán *et al.*, 1996 en CONABIO, 1998). De este patrimonio invaluable obtenemos un sin fin de servicios tangibles e intangibles, sustentados todos por el mantenimiento de la biodiversidad, de la cual derivan ingredientes claves de nuestras actividades agrícolas, industriales y farmacéuticas, ejemplo de este último caso es la obtención de paclitaxel a partir de los árboles del género *Taxus*.

De los cuatro “tejos” nativos del hemisferio occidental, el menos conocido es *Taxus globosa*, incluido actualmente en el listado de especies raras de México (SEDUE, 1991) y en la NOM-059-ECOL-2001 sujeta a Protección Especial “Pr”, por lo que se le considera una especie en peligro inmediato de desaparecer (SEDUE, 1991) si no se toman medidas destinadas a su conservación. Su desconocimiento, se debe en buena parte a su escasez en las áreas de distribución natural (Zavala *et al.*, 2001) pues se ha visto una reducción crítica de las poblaciones y del hábitat. El territorio mexicano es un país de tamaño mediano pero que posee una población bastante grande, lo que se traduce en una presión sobre sus zonas naturales (Mittermeier y Robles, 1997), ésto aunado a los desbalances que existen entre el desarrollo cultural y el equilibrio ecológico desencadenan un proceso de degradación ambiental, las causas en última instancia, son dos fuerzas de gran

---

---

extensión: una es el crecimiento rápido e insostenible de las actividades humanas y la otra es el conflicto frecuente entre los incentivos económicos individuales a corto plazo y el bienestar social a largo plazo (Leff, 2004).

Es responsabilidad humana proteger y preservar la biodiversidad, un tesoro que hoy por hoy ha sido poco valorado. Como una respuesta ante la necesidad de su conservación y sustentabilidad de su aprovechamiento farmacéutico, el cultivo *in vitro* se perfila como una atractiva alternativa.

## **2. El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV).**

Generalmente se considera a Haberlandt como el pionero en el desarrollo de esta técnica biotecnológica, pues en 1902 utilizó la idea de totipotencialidad celular desarrollando el primer cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, y aunque no tuvo éxito sentó las bases para que en la actualidad muchos científicos consiguieran darle un mayor impulso al cultivo *in vitro*, aplicándolo a una gran variedad de especies para la solución de problemas en las industrias químico-farmacéuticas, agrícola, hortícola y en la conservación de especies amenazadas.

### **2.1. Generalidades y aplicaciones del CTV.**

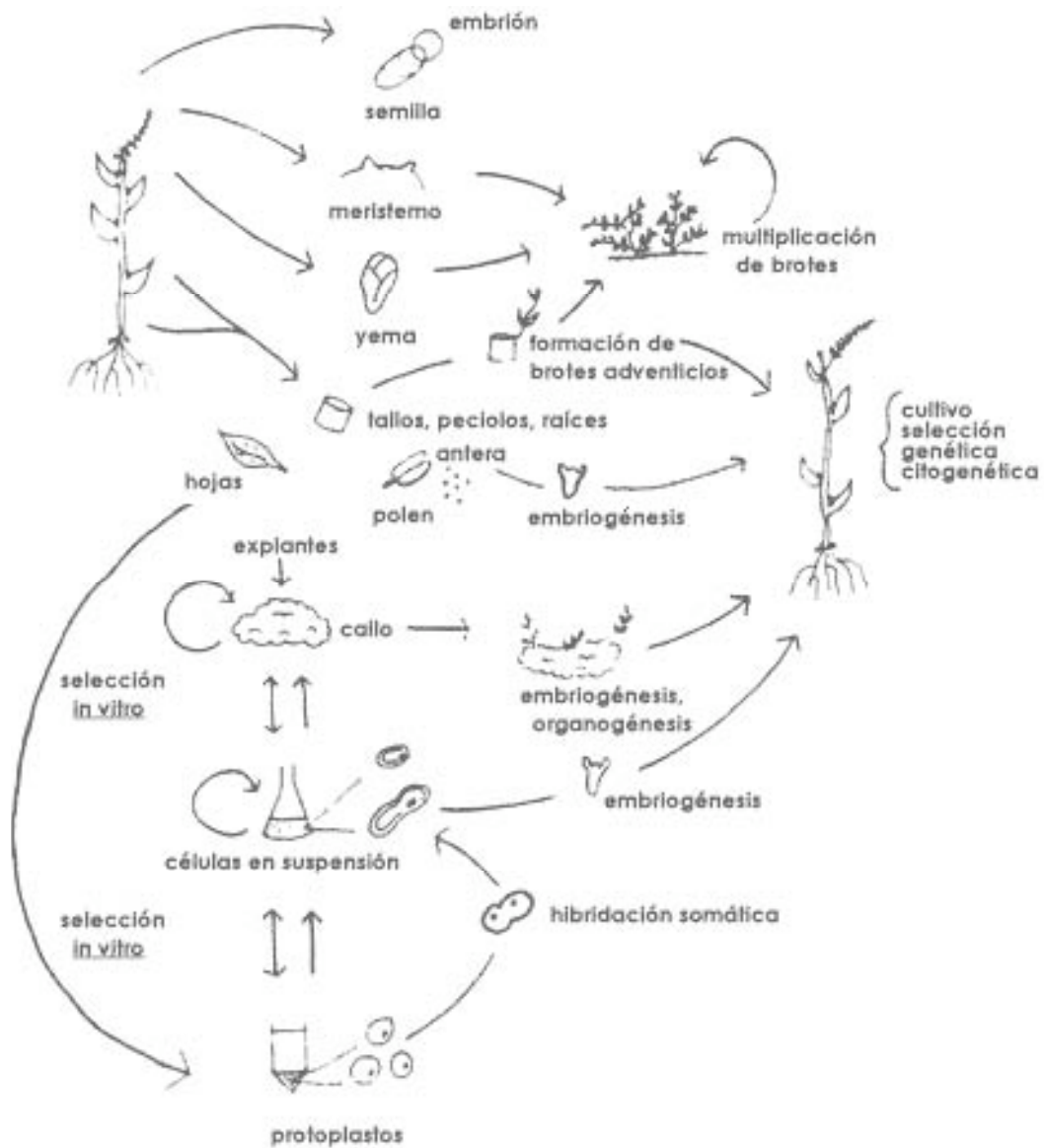
El CTV está fundamentado en la totipotencialidad celular para establecer un conjunto de técnicas que permiten cultivar asépticamente *in vitro* células, tejidos y órganos de plantas, en medios nutritivos artificiales y bajo condiciones controladas de pH, luz, temperatura, atmósfera y fitorreguladores, entre otras, haciendo posible dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de los mismos (Chávez, 1993), brindando así una importante alternativa para la investigación básica y aplicada.

George y Sherrington (1994) mencionan diferentes tipos de cultivos *in vitro*:

1. Cultivo de plantas intactas: Se siembra la semilla *in vitro* para finalmente obtener una planta.
2. Cultivo de embriones cigóticos: Se cultiva el embrión aislado después de retirar el resto de los tejidos de la semilla.
3. Cultivo de órganos: Por ejemplo, raíces, tallos, hojas. A una porción aislada de la planta que puede ser un órgano, tejido o células se le llama explante.
4. Cultivo de callo: Masa amorfa de células no diferenciadas en continua división.
5. Cultivo de células aisladas: Es el crecimiento de células individuales obtenidas mecánicamente o con ayuda de enzimas.

6. Cultivo de protoplastos: Se llama así al cultivo de células desprovistas de la pared celular por digestión enzimática.

La respuesta obtenida en el cultivo *in vitro* de un determinado explante (figura 3) decidirá sobre su utilidad para el logro de un objetivo propuesto (Roca y Mroginski, 1993), por lo que éste debe ser cuidadosamente seleccionado por su disponibilidad, su posición sobre la planta (que refleja el nivel de hormonas endógenas), baja contaminación de microorganismos y rápida respuesta *in vitro*, por lo que frecuentemente se opta por explantes de plantas jóvenes crecidas en invernadero o germinadas en condiciones asépticas.



**Figura 3.** Explantes usados en el CTV  
(Fuente: ver página electrónica en la bibliografía)

---

---

De acuerdo a Robert y Loyola (1985), en nuestro país, las actividades en este campo se iniciaron en 1970 en el Colegio de Postgraduados de Chapingo y posteriormente en la UNAM. La importancia en la difusión de estas técnicas, según estos autores, radica en su aplicación en disciplinas y objetivos variables como:

- 1) **Agricultura:** En la micropropagación de cultivares, preservación del germoplasma agronómico y silvestre y el mejoramiento genético
  - a) **La micropropagación:** De especies ornamentales y en la producción de cultivares, libres de patógenos, puede tener repercusiones de tipo económico muy importantes. Además es aplicable en la propagación de especies amenazadas o en peligro de extinción.
  - b) **La preservación del germoplasma:** El almacenamiento a bajas temperaturas tanto de células cultivadas como de plántulas en condiciones asépticas brinda la posibilidad de mantener tejidos somáticos por largos periodos de tiempo sin problemas de contaminación, de cambios ambientales o de falta de espacio.
  - c) **El mejoramiento genético:** A través de la selección de clonas somáticas con las características fisiológicas deseadas, o aumentando el rango de entrecruzamiento entre especies genéticamente distantes por medio del rescate de embriones de híbridos incapaces de desarrollarse en condiciones naturales, por fusión de protoplastos o mejoramiento genético.
- 2) **La industria química:** A través de la biosíntesis o la biotransformación de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*.
- 3) **El estudio de la bioquímica vegetal básica.** Mediante el estudio de la estructura y función de las proteínas, la regulación del ciclo celular o el metabolismo de biomoléculas, por mencionar algunos ejemplos.

## 2.2. Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).

La forma y función de un organismo multicelular depende de una extensa y eficiente comunicación de un vasto número de constituyentes celulares a través de mensajes y respuestas químicas. En las plantas superiores, la regulación y coordinación del metabolismo, su crecimiento y morfogénesis a veces depende de la señalización química de una parte de la planta a otra (Taiz y Zeiger, 2006).

Muchos conceptos sobre comunicación intercelular en plantas son derivados de estudios similares en animales y dado que en ellos los mensajes químicos que median la comunicación intercelular se les llama hormonas (Taiz y Zeiger, 2006), a los reguladores del desarrollo de las plantas también se les llegó a identificar como tales. No obstante, el nombre de "fitohormona" actualmente se restringe a los compuestos naturales y para las sustancias sintetizadas que actúan de forma similar a las fitohormonas el término se ha modificado al de "reguladores de crecimiento vegetal" (RCV) o "fitorreguladores".

Un factor importante en el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, fue el descubrimiento de los reguladores de crecimiento o fitorreguladores, que se definen como aquellas sustancias orgánicas que se sintetizan en pequeñas cantidades en alguna parte de la planta y que actúan en otra parte. El crecimiento y desarrollo de las plantas es posible gracias a un control homeostático entre estas sustancias estimulantes del crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas) y las inhibidoras del crecimiento (ácido abscísico y jasmonatos).

Los primeros cinco grupos de fitorreguladores naturales que se descubrieron fueron las giberelinas, el ácido abscísico, las citocininas, las auxinas y el etileno, pero también se han descubierto otros compuestos que de la misma manera tienen un rol regulador en el desarrollo de las plantas, como los brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y jasmonatos (tabla 3). Siendo pocos los que tienen un uso intensificado en el CTV (tabla 4).

**Tabla 3.** Principales características de los grupos de Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV). (Torres, 1988; Taiz y Zeiger, 2006).

Fito-hormona / RCV	Precursor	Lugar de Síntesis	Efecto	Naturales	Sintéticos
<b>Auxinas</b>	Triptofano	Meristemos	Alargamiento celular, Promueven división celular en CTV (callo, brotes, enraizamiento, embriogénesis somática)	AIA, AIB	ANA, 2,4-D, Dicamba, Picloram
<b>Citocininas</b>	Adenina	Meristemos, hojas y semillas en desarrollo	División celular, retrasa senescencia, diferenciación celular. Organogénesis en CTV.	Zeatina Trans-zeatina Cis-zeatina Dihidrizeatina 2iP	Kinetina, BAP o BA

<b>Etileno</b>	Metionina	Casi todos los órganos de las plantas superiores, según el tipo y estadio de desarrollo.	Respuesta a estrés, maduración de frutos, senescencia, abscisión de hojas, epinastia, geotropismo, germinación, diferenciación celular, floración y autocatálisis.	CH <sub>2</sub>	-----
	Ácido Mevalónico	Semillas inmaduras, en germinación y yemas	Induce floración, crecimiento, rompe latencia, acelera germinación.	AG <sub>3</sub> Existen alrededor de 112 giberelinas	-----
<b>Ácido abscísico</b>	Carotenos	Frutos, semillas, hojas, tallos, raíces	Inhibidor del crecimiento, acelera senescencia, latencia, induce cierre estomático.	ABA	-----
	Ácido Mevalónico	Hojas, flores, ápices y tallos. En menor cantidad en semillas y polen.	Influencia en la germinación, la rizogénesis, el florecimiento y la senescencia. También confieren resistencia al estrés abiótico.	Se conocen más de 40 Brs	-----
<b>Brasinoesteroides</b>	L-ornitina, L-arginina y L-metionina	Flores, hojas, raíces y frutos	Desarrollo, crecimiento, senescencia y respuesta a estrés biótico y abiótico	Diamina putrescina, triamina espermidina y la tetramina espermina	-----
<b>Ácido Salicílico</b>	Fenilalanina	Todos los órganos vegetales	Induce floración e incrementa la resistencia a patógenos	Ácido salicílico	-----
<b>Jasmonatos</b>	Ácido linolénico	Ápices de tallos, hojas jóvenes, frutos inmaduros y extremos de raíces.	Germinación, tuberización, floración, senescencia y respuesta a estrés biótico y abiótico	Éster metílico del ácido jasmónico (MeJA) y diversos derivados hidroxilados	-----

**Tabla 4.** Fitohormonas y RCV más utilizados en el cultivo *in vitro* (Torres, 1998).

Fitohormona o RCV	Simbología	Fórmula	Peso molecular (g/mol)
<b>AUXINAS</b>			
Ac. Indolacético	AIA, IAA	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	175.2
Ac. Naftalenacético	ANA, NAA	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	186.2
Ac. 2,4-Diclorofenoxiacético	2,4-D	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	221.3
Ac. Indolbutírico	AIB, IBA	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	202
Ac. 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico	DICAMBA	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	220
Ac. 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico	PICLORAM	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	241
<b>CITOCININAS</b>			
N-(2-furanilmetil)-1H-purina-6-amina	Kinetina	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O	215.2
6-(y,y-dimetilalilano)purina	2iP	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub>	203.2
6-bencilaminopurina o 6-benciladenina	BAP, BA	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>	225.3
6-(4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilamino)purina	Zeatina	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O	219
<b>GIBERELINAS</b>			
Ac. Giberélico	AG <sub>3</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	346.4

### 2.3. El CTV como alternativa para la obtención de metabolitos secundarios.

La obtención comercial de metabolitos secundarios se realiza mediante la extracción de la planta completa, pero su manufactura tiene asociados numerosos problemas relacionados con las variaciones del clima, plagas, transporte y almacenamiento, además de la sobreexplotación del recurso vegetal y el bajo rendimiento del producto. Por lo anterior, el CTV actualmente constituye una alternativa para sintetizar sustancias cuya producción comercial se ve limitada por los factores externos (Navarro y Vera, 1994) pues estos sistemas pueden proveer un suministro continuo y homogéneo de materia prima en un estadio fisiológico uniforme a causa de su independencia del medio ambiente. Varias plantas ahora se pueden cultivar en un estadio desdiferenciado, como callos y células en suspensión, que pueden manipularse para producir metabolitos secundarios de interés comercial (Robert y Loyola, 1985).

Para que el CTV sea útil como una fuente industrial alterna debe satisfacer varios requerimientos:

- 1) Un buen rendimiento de producto final.
- 2) La acumulación en la célula o la liberación al medio debe ser más rápida que la degradación.
- 3) Las células deben ser genéticamente estables, de manera que produzcan una cantidad constante del producto.

- 4) La producción tiene que ser costeable, por lo que el rendimiento de producto por unidad de tejido debe ser por lo menos el mismo que en el uso de plantas completas.

En la tabla 5 se muestran algunos metabolitos secundarios que se han logrado obtener a partir del CTV con éxito.

**Tabla 5.** Algunos productos producidos por CTV en cantidades iguales o que exceden las de las plantas completas (Robert y Loyola, 1985; Herrera, 2007).

<b>COMPUESTO</b>	<b>ESPECIE</b>
Ácido rosmarínico	<i>Coleus blumei; Anclusa officinalis</i>
Ajmalicina	<i>Catharanthus roseous</i>
Alcaloides	<i>Ruta graveolens</i>
Alliína	<i>Allium sativum</i>
Antraquinonas	<i>Cassia tora</i>
Berberina	<i>Thalictrum minus</i>
Biscoclaurina	<i>Stephania cepharbtha</i>
Cafeína	<i>Coffea arabica</i>
Capsaicina	<i>Capsicum annum</i>
Catarantina	<i>Catharanthus roseous; Morinda citrofolia</i>
Critosina	<i>Cryptolepis</i>
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea; D. Doryophora</i>
L-Efedrina, D-pseudoefedrina	<i>Ephedra spp.</i>
Esterol	<i>Eucaliptus tereticornis</i>
Fenólicos	<i>Acer pseudoplatanus</i>
Furanocumarinas	<i>Glehnia littoralis</i>
Galotaninos	<i>Rhus javanica</i>
Ginkgólido A	<i>Ginkgo biloba</i>
Ginsenósidos	<i>Panax notoginseng</i>
Glutación	<i>Nicotiana tabacum</i>
Inhibidores de proteína	<i>Scopolia japonica</i>
Naringina Limonina	<i>Citrus spp.</i>
Nicotina	<i>Nicotiana rustica</i>
Peniculida B	<i>Andrographis peniculate</i>
Plaunotol	<i>Croton sublyratus</i>
Podofilotoxina	<i>Podophyllum hexandrum</i>



Protopina	<i>Macleaya microcarpa</i>
Reserpina	<i>Rauwolfia sellowii</i>
Saponinas y sapogeninas	<i>Panax ginseng</i>
Serpentina	<i>Catharanthus roseous</i>
Shiconina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
Solasodina	<i>Solanum laciniatum</i>
Tebaína	<i>Papaver bracteatum</i>
Ubiquinona-10	<i>Nicotiana tabacum</i>

No obstante, a pesar de su potencial industrial el CTV aún se enfrenta con problemas que impiden su explotación comercial en la producción de metabolitos secundarios. Los problemas claves son: *crecimiento lento*, *inestabilidad genética*, *agregación celular*, *control de la diferenciación celular*, *incapacidad para crecer autótróficamente* y *factores morfológicos* (Robert y Loyola, 1985).

- **Crecimiento lento.** El crecimiento de las células vegetales es muy lento, la velocidad máxima corresponde a tiempos de duplicación de 20 a 60 horas aproximadamente, eso hace que los cultivos celulares a gran escala sean potencialmente caros, que las exploraciones de laboratorio sean difíciles y que se necesiten precauciones extremas para evitar la contaminación.
- **Inestabilidad genética.** Los cultivos de células vegetales deben de subcultivarse en intervalos de una a dos semanas, pues éstos, particularmente los callos, con frecuencia tienden a estar compuestos de una mezcla muy heterogénea de células y suelen presentar cambios cromosómicos. Además de que el cultivo primario puede perder la capacidad de producción a causa de las resiembras o cambios químicos.
- **Agregación celular.** Que limitan el transporte de los nutrientes y reguladores de crecimiento, provocando que las células del centro del agregado se diferencien parcialmente, mientras que las periféricas no. La heterogeneidad que dicho fenómeno provoca en los cultivos en suspensión puede introducir ambigüedades en las medidas experimentales y dificultar la ejecución física de cultivos continuos en el laboratorio.
- **Los reguladores de crecimiento** indispensables para la multiplicación y mantenimiento de los cultivos, pueden modificar drásticamente la

---

---

concentración de los productos secundarios de los cultivos o provocar la inestabilidad genética mencionada anteriormente.

- **Incapacidad para crecer autotróficamente.** Para procurar su crecimiento, es preciso suministrar una fuente de carbono ya que por lo general éstos no son fotosintéticos.

Para incrementar la productividad de los cultivos, se proponen una serie de posibles soluciones (Robert y Loyola, 1985; DiCosmo y Towers, 1984).

- **Optimización de las condiciones ambientales.** Los factores que afectan el rendimiento de la producción de compuestos secundarios son: componentes del medio, fitorreguladores, pH, temperatura, aereación, agitación y luz.
- **Adición de precursores, elicitores o por biotransformación:** Adicionando un metabolito secundario que se encuentre en pequeñas cantidades en la ruta biosintética, beneficiando la producción de algún compuesto conocido de la planta. O bien, al incorporar al cultivo un “elicitador”, factor biológico o químico que produce una respuesta de las células estimulando y aumentando la concentración del metabolito (León, 2007). Existen numerosos trabajos que indican que la adición de ciertos precursores de una vía puede incrementar el rendimiento. Sin embargo, en muchos casos no es así, por lo que debe tenerse en cuenta factores como la permeabilidad de la membrana, la compartimentalización del precursor añadido y su velocidad de degradación.
- **Selección de líneas celulares de alto rendimiento.** La selección de líneas celulares obtenidas a partir de tejidos con alto rendimiento, o bien la selección de clonas que produzcan o sobreproduzcan el compuesto deseado.
- **Diferenciación.** La expresión de los productos secundarios es un reflejo de cierto grado de diferenciación celular; por lo que algunos grupos de investigación se han enfocado en la obtención de cultivos con cierto grado de diferenciación, éste suele ser morfológico (como el cultivo de raíces o tallos), celular (como el desarrollo de cloroplastos y vacuolas) y química (al nivel de obtener otros compuestos que la planta no produce).
- **Criopreservación.** Permite almacenar líneas celulares de CTV con alto rendimiento para que periódicamente pueda recuperarse la línea que haya perdido su capacidad biosintética o se haya desestabilizado genéticamente.

- 
- **Ciclo de crecimiento.** Un factor muy importante a considerar es que los productos secundarios pueden acumularse durante una fase específica del ciclo de crecimiento de un cultivo; por ello habrá que determinar dicho periodo para obtener el mayor rendimiento del producto deseado y mantener al cultivo lo más cerca posible a dicho punto. Esto se logra por medio de las técnicas de cultivo continuo o semicontinuo, de manera que se pueda producir de forma constante.
  - **Inmovilización celular.** La ventaja de utilizar células inmovilizadas es facilitar la separación de los productos formados.

### **2.3.1. Inducción de callo y cultivos de células en suspensión.**

Un *callo* es una masa de células parenquimatosas (células grandes con paredes delgadas) indiferenciadas. Éste puede formarse naturalmente por el cambium alrededor de una herida, fungiendo como “tejido” cicatrizante. Pero en un cultivo *in vitro* puede generarse a partir de diversos explantes con la ayuda de la aplicación exógena de fitorreguladores, generalmente auxinas en combinación con citocininas en concentración semejante, aunque depende en gran medida del genotipo y el contenido endógeno de fitohormonas. Para la inducción, también son importantes otros factores como el medio nutritivo utilizado, la presencia o ausencia de luz y la temperatura.

A partir de la inducción de callo, pueden generarse diversas respuestas para la regeneración de plantas (embriogénesis u organogénesis indirectas), o bien puede utilizarse como inóculo para mantener células en suspensión.

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares casi homogéneos (Villaviscencio, 2002) distribuidos en un medio nutritivo líquido y en agitación constante. Se inician generalmente mediante la incubación de trozos de callos friables en los medios líquidos que están en movimiento continuo, comúnmente utilizando matraces Erlenmeyer (Roca y Mroginski, 1993). Para mantener cultivos en suspensión existen una serie de reglas generales (León, 2007).

1. Normalmente se utilizan agitadores rotativos que favorecen la proliferación del cultivo y su oxigenación.
2. En general se considera que la velocidad de giro debe situarse entre 80 y 100 rpm, aunque a veces se utilizan más bajas (40) o más altas (120).

- 
- 
3. Los matraces nunca se deben llenar más de un 20-30% de su capacidad total.
  4. La producción rápida de células en los cultivos en suspensión es proporcional a la densidad celular, en el momento de inicio del cultivo.

Los medios en suspensión pueden clasificarse en 3 tipos (Roca y Mroginski, 1993) según la técnica que se siga.

1. Cultivos cerrados: En éstos, las células producidas se quedan en el medio, aumentando la densidad celular. Cuando la suspensión alcanza la fase estacionaria (se detiene el crecimiento celular), se toman fracciones de ella para subcultivarlas en medio fresco y reiniciar el ciclo de crecimiento.
2. Cultivos continuos cerrados: En estos sistemas, se suministra a la solución medio fresco de forma continua y simultáneamente se retira el medio usado. Las células separadas mecánicamente se acumulan en el sistema.
3. Cultivos continuos abiertos: Al igual que en el sistema anterior hay un suministro de medio fresco. Pero el medio usado sale junto con las células.

Para medir el crecimiento de las suspensiones celulares se utilizan diversos métodos, los más recurridos son (Roca y Mroginski, 1993):

- o *Número de células*: Para usarlo es necesario disgregar grupos celulares en agregados de no más de 10 células y hacer conteo de células con un microscopio.
- o *Volumen celular*: Se toma un volumen conocido de la suspensión y se centrifuga para que se sedimenten, luego se determina el volumen de éstas y se expresa en ml de células por ml de cultivo.
- o *Peso fresco*: Sobre un papel filtro previamente pesado, se colocan las células lavadas con agua destilada y se pesan. No es recomendable para cantidades pequeñas de células.
- o *Peso seco*: Se determina de manera similar al peso fresco, pero antes de pesar las células se secan a 60° C durante 12 h como mínimo, preferentemente al vacío.
- o *Turbidez*: Se mide con fotolorímetro, con filtro azul a 400-465 nm.

### **2.3.2. Cinética de crecimiento.**

Al mantener un cultivo celular para la producción de metabolitos secundarios debe considerarse el ciclo de crecimiento del mismo, pues los productos secundarios

---

---

pueden acumularse durante una etapa específica, así que para obtener el mayor rendimiento del producto deseado habrá que determinar dicho periodo y mantener el cultivo lo más cerca posible a dicho punto.

El monitoreo de las fases de crecimiento de un cultivo puede hacerse mediante las curvas o cinéticas de crecimiento (figura 4). Este crecimiento generalmente se produce de la siguiente forma: inicialmente durante la fase de latencia, lag o reposo, el inóculo prácticamente no presenta división celular ya que únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones nutricionales, puede suceder que haya un aparente incremento en el peso fresco debido a la incorporación de agua a las células. La fase lag es una etapa preparatoria para las fases posteriores y se caracteriza por el incremento en los niveles de NADPH y ATP, en la actividad glucolítica y vía de las pentosas fosfato (Flower, 1971) así como un incremento en el contenido de ARN celular (Kanamori *et al.*, 1979) junto con el incremento de la síntesis proteica y una eficiente capacidad ribosomal (Verma y Marcus, 1974).

Posteriormente, una vez que la división celular ha sido inducida, la fase exponencial procede rápidamente y si se adiciona medio fresco podrá continuar, en la fase tardía de la división celular se presenta un pico de producción de etileno (Villaviscencio, 2002). Durante las fases exponencial y lineal, la velocidad de división celular se incrementa y con ello aumenta la biomasa, hasta que un factor en el medio de cultivo se vuelve limitante (nitratos u oxígeno) y la división va disminuyendo gradualmente hasta entrar en fase estacionaria donde el peso seco disminuye (Pierik, 1990; León, 2007). Durante esta última fase las células han alcanzado su máxima división celular permaneciendo viables pero sin división (Hurtado y Merino, 1994) y es aquí donde por lo general los metabolitos secundarios se producen en mayor cantidad, dado el estrés por el que pasa el cultivo.

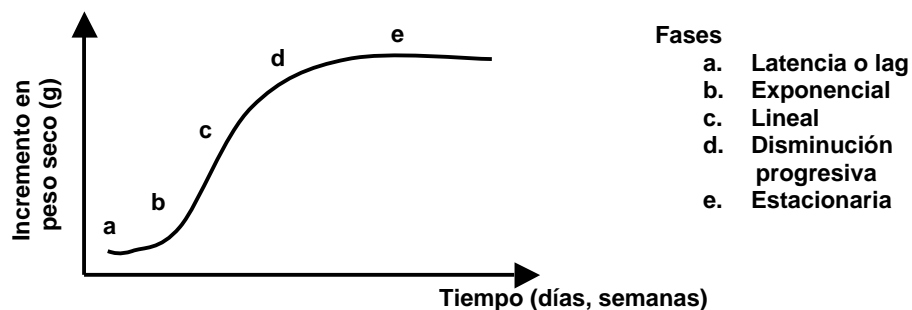


Figura 4. Modelo de una cinética de crecimiento y sus fases.

---

---

La duración y amplitud de la curva depende entre otras cosas de la especie y las condiciones del tejido (Hurtado y Merino, 1994).

### **3. Metabolismo secundario**

El metabolismo puede definirse como el conjunto de procesos químicos que tienen lugar en las células vivas, envolviendo dos procesos contrarios y al mismo tiempo complementarios: anabolismo (reacciones de biosíntesis) y catabolismo (reacciones de degradación). Los productos resultantes se han dividido con cierta arbitrariedad en dos grupos: metabolitos primarios y metabolitos secundarios (Gros *et al.*, 1985).

El metabolismo primario, considera aquellos procesos que tienen que ver con la sobrevivencia y reproducción de la planta o cualquier otro organismo vivo, por lo que está ampliamente distribuido (Gros *et al.*, 1985), incluye por tanto a la fotosíntesis, glucólisis, respiración, síntesis de biomoléculas, etc. Mientras que el metabolismo secundario, es un proceso único que caracteriza químicamente a un grupo o taxón, incluso al nivel de especie. Su biosíntesis es a partir de los metabolitos primarios (Gros *et al.*, 1985) y sus productos, o metabolitos, fueron considerados anteriormente con poca importancia vital, pero actualmente son muy valorados pues intervienen en un sinnúmero de interacciones ecológicas como ventajas competitivas, defensas ante depredadores, atracción a polinizadores o comunicación en grupo, por mencionar algunos. De hecho, ciertos compuestos de este tipo se encuentran presentes en todas las plantas y son esenciales para su sobrevivencia, por ello, en algunos casos es difícil establecer una frontera definida entre metabolitos secundarios y primarios (Anaya, 2003). Razón por la cual, el nombre de "metabolitos secundarios" suele cambiarse al de "productos naturales", los cuales en muchas ocasiones, son utilizados con algún interés industrial, como colorantes, fragancias, pesticidas, saborizantes o fármacos.

#### **3.1. Generalidades de los metabolitos secundarios.**

De todos los metabolitos secundarios presentes en plantas, sólo se ha elucidado la estructura de unos cuantos. La producción de estos compuestos es muy baja (menos del 1% del peso seco) pues muchos de éstos tienen una estructura compleja que depende de la fisiología y estado de desarrollo de la planta, además en algunas ocasiones también están interrelacionados con condiciones de estrés biótico y abiótico (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004). Éstos, son producidos en órganos y/o células específicos de la planta, acumulados en algunos casos en

---

---

vacuolas (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004) y se caracterizan a grandes rasgos, por lo siguiente (Anaya, 2003):

- La gran heterogeneidad de su estructura química.
- Su distribución restringida.
- Su formación por medio de enzimas codificadas por material genético expresado sólo en condiciones especiales.
- El control estricto de su biosíntesis, por medio de la regulación de la cantidad de enzimas involucradas y de la actividad de éstas.
- La compartimentación de enzimas, precursores, intermediarios y productos involucrados en su biosíntesis, almacenamiento y desintegración.
- La expresión del metabolismo secundario como un aspecto de especialización celular, o bien, de la formación de nuevas células especializadas que se integran en los programas de diferenciación y desarrollo del organismo productor.
- La importancia relativa para la célula sintetizadora como tal, y la mayor importancia para el organismo como un todo.
- La falta de continuidad filogenética en muchos de ellos.

Su origen biosintético está constituido por los compuestos químicos que se producen al final de la glicólisis, el fosfoenol piruvato, el piruvato y la acetil CoA, cualquier excedente de estos compuestos puede desviarse hacia el metabolismo secundario, demostrando que las dos formas de metabolismo están interrelacionadas, el metabolismo primario provee un cierto número de moléculas que son empleadas como materiales precursores de todas las vías metabólicas secundarias importantes (Seigler, 1981).

Existen tres precursores químicos principales del metabolismo secundario:

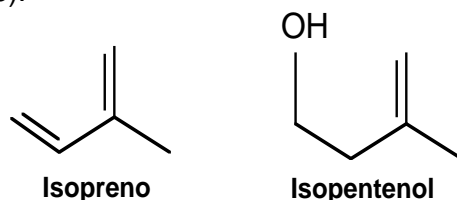
1. El ácido shikímico, precursor de muchos compuestos aromáticos.
2. Los aminoácidos, que dan origen a los alcaloides y los antibióticos.
3. El acetato, precursor de los poliacetilenos, las prostaglandinas, antibióticos macrocíclicos, polifenoles e isoprenoides (terpenos, esteroides y carotenoides).

Actualmente se conocen cientos de miles de productos naturales y se siguen biosintetizando más, gracias a las interacciones bióticas inter e intraespecíficas y a la continua evolución de los organismos (Anaya, 2003).

### 3.2. Clasificación de los metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios pueden clasificarse, desde el punto de vista biosintético en cinco grupos químicos principales: policétidos (acetogeninas), isoprenoides (terpenoides), alcaloides, fenilpropanoides y flavonoides (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004; Whittaker y Fenny, 1971).

El paclitaxel, pertenece al grupo de los terpenoides. Este grupo de metabolitos secundarios son una diversa clase de productos naturales que tienen muchas funciones en el reino vegetal y en la salud y nutrición humana, se conocen alrededor de 40 000 diferentes y varios de ellos son importantes agentes farmacéuticos, estructuralmente están formados por unidades de isopreno (Roberts, 2007) en una cadena lineal, o bien de una variación de esta misma unidad, el isopentano, la forma completamente saturada de esta molécula de cinco carbonos (Valencia, 1995) (figura 5).



**Figura 5.** Isopreno: Unidad estructural de los terpenoides y su forma saturada.

Dada su unidad estructural, los terpenos poseen átomos de carbono en múltiplos de cinco, clasificándose en los grupos que aparecen en la tabla 6.

**Tabla 6.** Clasificación de terpenos (Anaya, 2003; Valencia, 1995).

Nombre	Unidades de isopreno	Número de carbonos	Ejemplos
Hemiterpenos	1	5 (1 x 5)	Isopreno, isopentenol, alcohol, dimetilalílico
Monoterpenos	2	10 (2 x 5)	Aceite esenciales (geraniol, mentol, timol) Aceites esenciales (farnesol, bisabolol),
Sesquiterpenos	3	15 (3 x 5)	ácido abscísico, hormonas juveniles
Diterpenos	4	20 (4 x 5)	Resinas ácidas, agentes antitumorales ( <b>paclitaxel</b> )
Sesterterpenos	5	25 (5 x 5)	Extractos de lípidos insaponificables
Triterpenos	6	30 (6 x 5)	Escualeno, esteroides



Tetraterpenos (carotenoides)	8	40 (8 x 5)	Carotenos, xantofilas
Politerpenos	>8	(n x 5)	Espandicol, hule

Estos compuestos pueden ser formados en citosol o cloroplastos, a través de la vía del ácido mevalónico o utilizando la ruta del G3P/piruvato, sus precursores, principalmente el Isopentenil pirofosfato (IPP), pueden ser incorporados en otra ruta metabólica (Barkovich y Liao, 2001).

#### 4. Paclitaxel (Taxol®).

El paclitaxel es un compuesto químico que puede extraerse de los árboles del género *Taxus*, específicamente es un diterpeno (con 20 átomos de carbono), clasificado como taxano, debido a que consiste en un sistema tricíclico y con una conformación altamente plegada, se caracteriza por poseer un anillo A de seis miembros con conformación de bote *cis*, fusionado a un anillo B de ocho miembros, el cual a su vez tiene una conformación de silla-bote; el anillo restante de seis miembros C, tiene una conformación de silla modificada y se fusiona con el anillo B en forma *trans* (Cruz, 1998) (figura 6).

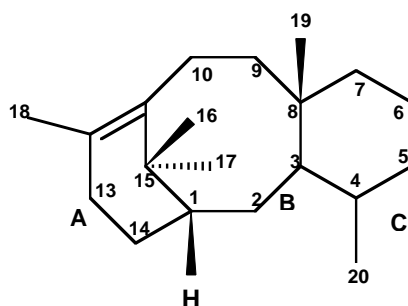
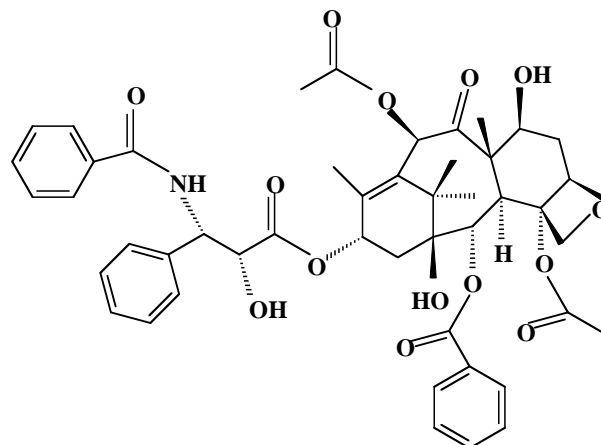


Figura 6. Esqueleto de un Taxano

##### 4.1. Características químicas del paclitaxel.

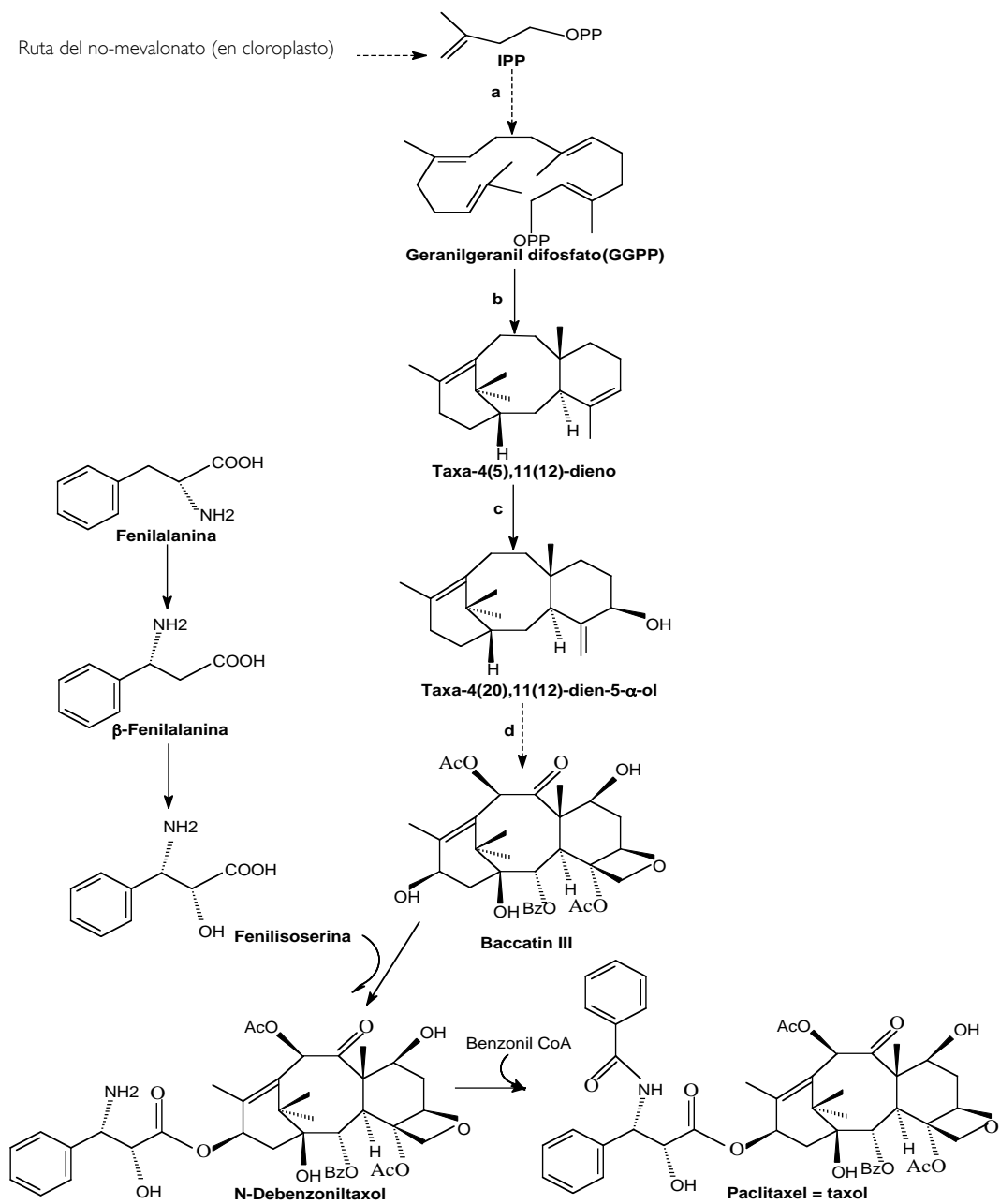
Se conocen más de 200 taxanos los cuales pueden clasificarse por la sustitución de ciertos átomos de carbono. En particular, el paclitaxel (figura 7) pertenece al grupo de los “Taxoides con un anillo de oxetano en 4-5”, dentro de la subclase “taxanos con anillo de oxetano” (Cruz, 1998).



**Figura 7.** Estructura química del paclitaxel

Al ser un isoprenoide, su producción es a partir de la condensación consecutiva de su unidad precursora de 5 carbonos, el isopentenil difosfato (IPP) o de su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP), sintetizados a través de dos rutas conocidas: 1) Ruta del mevalonato; 2) Ruta del no-mevalonato. La primera, como menciona Kuzuyama (2002), opera en arqueobacterias, en el citosol de plantas superiores y en otros eucariotes y da origen a los sesquiterpenos, la segunda, descubierta por Rohmer, es usada por muchas eubacterias, algas verdes y en el cloroplasto de plantas superiores involucrando cinco pasos, donde las enzimas ya han sido identificadas, a partir de esta ruta se producen los monoterpenos y los diterpenos (Covantes, 2008).

En la biosíntesis de taxanos se ha demostrado que la formación del precursor IPP es obtenido por la ruta alterna de biosíntesis isoprenoide propuesta por Rohmer (Cruz, 1998). Por lo anterior, se sabe que la síntesis del paclitaxel y de otros taxanos relacionados, se lleva a cabo en los cloroplastos y en algunos pasos es considerada dependiente del Citocromo P450 (Jennewein y Croteau, 2001; Zhong, 2002) (figura 8).



**Figura 8.** Ruta biosintética del paclitaxel en *Taxus spp.* Las enzimas indicadas son: a) Geranilgeranil difosfato sintetasa (GGPP); b) taxadieno sintetasa; c) Citocromo P450 taxadieno 5  $\alpha$ -hidroxilasa; d) Citocromo P450 monooxigenasa (Zhong, 2002).

---

---

## 4.2. Importancia farmacéutica y mecanismo de acción del paclitaxel.

Además de ser usados como leña, carbón y ornato, los árboles del género *Taxus* son fuente de un gran número de compuestos farmacéuticamente activos de diferentes clases, en especial del paclitaxel, un compuesto quimioterapéutico para el tratamiento del cáncer de pulmón, seno y ovario (Da Cheng *et al.*, 2008).

Se sabe que la multiplicación celular está cuidadosamente regulada, pero que cuando ésta falla las células comienzan a crecer y dividirse en forma descontrolada, la descendencia propensa a proliferar da como resultado una población celular capaz de expandirse en forma indefinida. Estas células no deseadas forman una masa denominada tumor, algunos de ellos no tienen consecuencias graves para la salud, pero los que se diseminan por todo el organismo por lo general producen enfermedad, el cáncer es causado por la acumulación de varias mutaciones en células somáticas, de genes que regulan la multiplicación celular normal (Lodish *et al.*, 2003). Este padecimiento, que afecta a personas de todas las edades y condiciones, es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial mencionadas por la OMS. Su tratamiento se efectúa con anticancerígenos tanto de origen sintético como natural, dentro de estos últimos se consideran cinco de origen vegetal: dos alcaloides, la vinblastina y vincristina, aislados a partir de *Catharantus roseus* (Apocynaceae); un lignano, la podofilotoxina, obtenido a partir de *Podophyllum peltatum* y *P. emodii* (Podophyllaceae); otro alcaloide, la campotecina, extraído de *Campoteca acuminata* (Nyssaceae); y un diterpeno, el paclitaxel, aislado de *Taxus* sp. (Guerrero, 1997).

El paclitaxel es muy complejo estructuralmente (Rowinsky *et al.*, 1990) y como anticancerígeno posee un mecanismo de acción muy exclusivo que fue reportado por los científicos del Albert Einstein Medical College en 1980 e involucra a los microtúbulos que son estructuras celulares peptídicas implicadas en la formación del citoesqueleto, transmisión de señales celulares, reorganización de organelos, movimiento celular e indispensables para la división celular (Guerrero, 1997; Rowinsky *et al.*, 1990). Estas estructuras están compuestas por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$  tubulina) que se unen a dos moléculas de trifosfato de guanosina (GTP), el resto del microtúbulo se forma por proteínas asociadas a microtúbulos (PAMs). La polimerización de los microtúbulos se inicia con la formación de un heterodímero formado por la unión de una molécula  $\alpha$  tubulina y una de  $\beta$  tubulina, en presencia

de  $Mg^{2+}$  y GTP, después de cierto periodo de crecimiento, la concentración de microtúbulos-tubulina libre alcanza un equilibrio; pero si la concentración de tubulina es menor que el valor requerido para el equilibrio, la asociación espontánea no ocurre y se lleva a cabo un rápido reacomodo para alcanzar el equilibrio (Guerrero, 1997; Waugh y Wagstaff, 2004; Rowinsky *et al.*, 1990). El paclitaxel afecta dicho equilibrio, disminuyendo la concentración crítica de la tubulina y el tiempo de inducción para la polimerización en ausencia o presencia de GTP, PAMs y  $Mg^{2+}$ , la falta de tubulina libre inhibe la formación del huso mitótico, deteniendo a las células en la transición de interfase a mitosis (fases  $G_2$  y M del ciclo celular) (Guerrero, 1997; Nicolaou, 1994; Waugh y Wagstaff, 2004; Rowinsky *et al.*, 1990). De esta manera se inhabilita la división celular y por tanto la proliferación excesiva característica de las células cancerígenas.

Clínicamente las concentraciones relevantes de paclitaxel van de 0.1-10.0  $\mu\text{mol/L}$  pues puede producir mínimas inhibiciones de ADN, ARN y síntesis de proteínas, demostrando así que el paclitaxel bloquea el paso del ciclo celular a las fases mitóticas (Rowinsky *et al.*, 1990). Por ello, en general están indicados para los procesos cancerígenos como carcinoma de pulmón, metastásico o localmente avanzado, carcinoma mamario, carcinoma ovárico, sarcoma de Kaposi vinculado al SIDA, leucemias y también puede ser combinado con otros fármacos para su aplicación en determinadas patologías, pero éstas se encuentran aún en período de investigación farmacológica.

La forma en que se comercializa (tabla 7) es en una solución viscosa, traslúcida, incolora a ligeramente amarillenta.

**Tabla 7.** Cantidades y precios comerciales de Taxol®

Vial (ml)	Paclitaxel (mg)	Precio con IVA (€) 2005
5	30	165,08
16,7	100	463,32
25	150	---
50	300	1.296,58

El paclitaxel, como muchos otros medicamentos, presenta efectos secundarios tóxicos como la alopecia, entumecimiento, hipersensibilidad, disminución de leucocitos y por tanto efectos sobre el sistema gastrointestinal y neurológico (Rowinsky *et al.*, 1990). No obstante, de acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer y la Asociación Americana del Cáncer, se cree que los riesgos asociados

---

---

con el Taxol son menores en comparación a los beneficios que ofrece a las personas con cáncer avanzado.

### **4.3. Producción de paclitaxel a partir de *Taxus sp.***

Fue en la década de los sesentas cuando por primera vez se aisló el paclitaxel, a partir de un extracto de *Taxus brevifolia* (tejo del Pacífico) debido a un programa de investigación con plantas como posibles agentes terapéuticos, desarrollado por el National Cancer Institute (NCI) de Estados Unidos, el paclitaxel o Taxol® demostró actividad citotóxica sobre líneas celulares leucémicas, pero fue hasta 1971 cuando se elucidó su estructura molecular (Rowinsky *et al.*, 1990) y en 1992 cuando se aprobó por la FDA para su uso en humanos como agente anticancerígeno.

Actualmente se sabe que *Taxus* es el único género de la familia con una gran importancia económica y medicinal (Vance y Rudolf, FAO) y que todas las especies del género son productoras del compuesto, aunque el contenido de taxanos entre las diferentes especies y cultivares es variable (Da Cheng *et al.*, 2008).

Para obtenerlo se utilizaba la delgada corteza, de aproximadamente 3 mm, de *T. brevifolia* y para mejorar el rendimiento se elegían individuos de unos 100 años de edad, con 3 kg de corteza, de los cuales se puede obtener 300 mg de paclitaxel, esto significa que cerca de seis árboles de 100 años de edad debían ser sacrificados para el tratamiento de cada paciente (Guerrero, 1997; Cruz, 1998; Soto *et al.*, 2000; Rowinsky *et al.*, 1990), considerando su escasa producción, 0.01% (Tabata, 2004; Yukimune *et al.*, 1996), y que éstos no sobreviven al descortezamiento (Guerrero, 1997) la cantidad de plantas involucradas en la extracción de taxol hizo peligrar a la especie. Incluso, en 1991 se presentó el conflicto de que era más importante salvar el árbol o la vida de una persona, y la Universidad de Stanford, publicó un artículo bajo el nombre de "Save a tree or save a life". Y por ello, las plantas de *Taxus sp.* reconocidas como importante fuente de paclitaxel ahora están protegidas y se propuso el desarrollo de vías alternativas de producción, pues por sus propiedades antineoplásicas adquirieron gran relevancia en el área farmacéutica (Wani *et al.*, 1971; Arbuck y Blaylock, 1995) elevando su demanda a nivel mundial.

Algunas vías alternativas para la producción de este metabolito secundario son las siguientes:

- Síntesis química: La síntesis total fue llevada a cabo (Kingston, 1991; Nicolau *et al.*, 1994) y divulgada a mediados de los 90's. Este trabajo

---

---

representó una hazaña química importante, pero no factible para la industria farmacéutica debido a que utiliza varios pasos (Strobel, 2001) con elevados costos de producción a nivel industrial (Holton *et al.*, 1994; Nicolaou *et al.*, 1994) incrementando el costo del compuesto.

- Semisíntesis: Empleo de sustancias precursoras, por ejemplo, el 10-deacetilbaccatin III (10-DAB) un taxano diez veces más abundante que el paclitaxel en los tejos (Strobel, 2001). Con este precursor se ha podido elaborar un análogo al taxol, llamado docetaxel (Taxotere®).
- Hongos endófitos: También se ha investigado la asociación entre estos árboles y algunos hongos endófitos (*Taxomyces andreane*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium* y *Alternaria*) que contribuyen a la producción de taxol. Sin embargo, este sistema microbiano no tiene una producción sostenible del fármaco (Stierle *et al.*, 1993).
- Ingeniería Genética: En células no vegetales, con una mayor tasa de crecimiento para producir más taxol, transfiriendo la capacidad enzimática de la planta a hongos o bacterias y así usar a estos organismos en la producción del compuesto.
- Desarrollo de cultivos celulares vegetales: Por esta técnica alternativa, la producción del compuesto puede ser controlada y las condiciones de cultivo reproducibles, independientemente de los factores geográficos y climáticos.

En la década pasada, la producción de paclitaxel por cultivos celulares vegetales en suspensión fue intensamente explorada (Gibbson *et al.*, 1995), la elicitación ha demostrado ser de los métodos más eficaces para aumentar la acumulación de paclitaxel (Luo *et al.*, 2001) pues la acumulación de paclitaxel y taxanos relacionados en estas plantas es a través de respuestas biológicas a estímulos externos específicos, referidos por Yukimune y colaboradores (1996) como señales de transducción, incluyendo hormonas, poliaminas y elicitores fúngicos.

Algunos elicitors abióticos usados para inducir la biosíntesis del paclitaxel son el metil jasmonato (Ketchum *et al.*, 1999, Yukimune *et al.*, 1996), el ácido benzoico (Fett-Neto *et al.*, 1994), el cloruro de clorocolina (Barrios *et al.*, 2009), el quitosán y el Ag<sup>+</sup> (Zhang *et al.*, 2000) entre otros. El cultivo celular que responde a la elicitación con metil jasmonato es el más prometedor para incrementar la síntesis de paclitaxel, baccatina III y cephalomanina (Ketchum *et al.*, 1999; Tabata, 2004; Yukimune *et al.*, 1996) de *Taxus sp* (tabla 8).

Los jasmonatos juegan un importante rol en los procesos de señales de transducción que regulan los genes de defensa en plantas, inducen la síntesis de inhibidores de proteinasas, los niveles de ácido jasmónico endógeno incrementan en respuesta a un estímulo externo (Yukimune *et al.*, 1996). Se ha demostrado que los jasmonatos pueden inducir la producción de metabolitos secundarios en cultivos en suspensión, como alcaloides en *Catharanthus* y *Cinchona* y ácido rosmarico en *Lithospermum* (Yukimune *et al.*, 1996). El ácido jasmónico también ha sido usada en el cultivo de muchas especies de *Taxus* y los agentes citostáticos pueden ser incrementados en escala industrial (Yukimune *et al.*, 1995).

**Tabla 8.** Comparación de producción de taxanos en *Taxus sp.* con y sin la adición de metil jasmonato (MeJA) (Tabata, 2004; Yukimune *et al.*, 1996).

Especie	MeJA ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Producción celular( $\text{g L}^{-1}$ )	Paclitaxel (%)	( $\text{mg L}^{-1}$ )	Baccatina III (%)	( $\text{mg L}^{-1}$ )	Cephalomanina (%)	( $\text{mg L}^{-1}$ )
<i>T. baccata</i>	0	24.7 $\pm$ 0.7	0.002 $\pm$ 0.000	0.4 $\pm$ 0.0	0.002 $\pm$ 0.000	0.4 $\pm$ 0.0	0.030 $\pm$ 0.003	7.3 $\pm$ 0.5
	100	21.0 $\pm$ 0.4	0.229 $\pm$ 0.009	48.3 $\pm$ 2.5	0.245 $\pm$ 0.009	53.6 $\pm$ 2.2	0.017 $\pm$ 0.000	3.6 $\pm$ 0.1
<i>T. brevifolia</i>	0	18.5 $\pm$ 0.4	0.001 $\pm$ 0.000	0.2 $\pm$ 0.0	n.d.	n.d.	0.001 $\pm$ 0.000	0.1 $\pm$ 0.0
	100	14.6 $\pm$ 0.3	0.004 $\pm$ 0.000	0.5 $\pm$ 0.1	0.005 $\pm$ 0.000	0.8 $\pm$ 0.1	0.005 $\pm$ 0.000	0.7 $\pm$ 0.1
<i>T. x media</i>	0	23.6 $\pm$ 0.2	0.120 $\pm$ 0.009	28.2 $\pm$ 2.4	0.007 $\pm$ 0.000	1.6 $\pm$ 0.1	0.022 $\pm$ 0.001	5.3 $\pm$ 0.2
	100	18.2 $\pm$ 0.5	0.606 $\pm$ 0.022	110.3 $\pm$ 4.9	0.139 $\pm$ 0.015	25.2 $\pm$ 2.6	0.054 $\pm$ 0.003	9.8 $\pm$ 0.6

n.d. = no detectado

La diferencia en los niveles de producción de paclitaxel puede ser debida no sólo por los componentes del medio de cultivo o los periodos de cultivo, otra consideración importante en las condiciones del cultivo es el componente gaseoso (Tabata, 2004), como el etileno, que en diversos estudios se ha visto implicado en varias respuestas fisiológicas. El etileno, también llamado eteno, es el alqueno más sencillo, en 1934 se le identificó como un producto natural del metabolismo de las plantas y por sus efectos en éstas es clasificado como fitohormona. Es complicado catalogar al etileno como inhibidor o estimulante del crecimiento vegetal pero se sabe que promueve procesos de degradación que aumentan la permeabilidad de las membranas (activa permeasas), estimulando la excreción de enzimas degradativas y acelera el metabolismo respiratorio (Taiz y Zeiger, 2006) por lo que la autocatálisis y la senescencia son algunos de sus efectos, que en cultivo de tejidos puede traducirse también en oxidación y pérdida de biomasa. Para controlar dichos efectos, existen dos opciones:



- 
- Inhibir su síntesis: para lo cual es muy utilizado el AVG (aminoetoxi-vinilglicina) y el AOA (ácido amino-oxiacético) que bloquean la conversión de AdoMet (5-adenosilmetionina) a ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) que es precursor del etileno; o el ión  $\text{Co}^{2+}$  que bloquea la conversión de ACC a etileno, aunque también influyen condiciones físicas como la ausencia de oxígeno o una temperatura mayor a  $35^{\circ}\text{C}$ .
  - Inhibir su acción: en este caso, el objetivo es bloquear la unión del etileno a su receptor y uno de los métodos más registrados es por medio del ión  $\text{Ag}^{+}$ , aplicado en nitrato de plata,  $\text{AgNO}_3$ , o tiosulfato de plata,  $\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)$ , debido a su especificidad como sustituyente del ión  $\text{Cu}^{2+}$  que el etileno necesita como cofactor al unirse a su receptor, al suplir al cofactor los cambios normales que la proteína debería tener para el ensamblaje no ocurren y la afinidad disminuye (Taiz y Zeiger, 2006). A este nivel también puede afectar una alta concentración de  $\text{CO}_2$  (en un intervalo de 5-10%) que es un antagonista bajo condiciones naturales, pero es menos eficiente que el  $\text{Ag}^{+}$ .

En los cultivos celulares en suspensión de *Taxus* ha sido posible relacionar los niveles de etileno con la producción de paclitaxel aunque no directamente pues no se conocen las reacciones o componentes que la promueven, pero los inhibidores de este gas son candidatos a inducir la biosíntesis de paclitaxel (Tabata, 2004).

#### **4.4. Producción de paclitaxel de *T. globosa***

A pesar de que se ha trabajado intensamente en la producción de paclitaxel en varias especies de *Taxus*, el tejo mexicano (*T. globosa*) sigue siendo el menos estudiado y poco aprovechado. Estudios como el realizado por el Dr. Soto y colaboradores (2000) y por Shemluck y colaboradores (2003), han demostrado que nuestro recurso también posee un elevado potencial para la producción de taxol y mayor biosíntesis de éste en las acículas que en la corteza (tablas 9 y 10) y plantean la posibilidad del cultivo celular a partir de hojas lo cual contribuiría enormemente a su conservación.

**Tabla 9.** Contenido de taxol en *Taxus globosa* (Soto *et al.*, 2000)

Órganos analizados	Peso seco en %, N=5
Corteza	0.0085 ± 0.000235
Agujas	0.0130 ± 0.00122
Tallos	0.0064 ± 0.00068

**Tabla 10.** Comparación de niveles de taxol, cefalomanina y baccatina III en seis especies del género *Taxus* (% en peso seco) (Shemluck *et al.*, 2003)

Especie	% Taxol	% Cefalomanina	% Baccatina III
<i>T. globosa</i>	0.0121	0.0144	0.0129
<i>T. baccata</i>	0.0088	0.0246	0.0285
<i>T. brevifolia</i>	0.0081	0.0093	0.0466
<i>T. cuspidata</i>	0.0077	0.0237	0.0322
<i>T. media</i>	0.0056	0.0242	0.0243
<i>T. floridana</i>	0.0060	0.0033	0.0012

En el 2009, Barrios y colaboradores publicaron por primera vez la producción de paclitaxel de *Taxus globosa* bajo condiciones *in vitro*, a partir de callos de brotes maduros de plantas adultas, y evaluaron su incremento a causa de cloruro de clorocolina (CCC) como elicitador, el rendimiento máximo que obtuvieron fue de 0.0269 mg g<sup>-1</sup> de peso seco utilizando 0.5 mg L<sup>-1</sup> de CCC.

Y en el 2010, Barradas-Dermitz y colaboradores establecen líneas celulares de diversos explantes de *T. globosa* (tallos internodales, hojas y meristemos) e identificaron una mayor producción de baccatina III en la línea proveniente de tallo usando 1 µM de MeJA, no obtuvieron la producción de paclitaxel en ninguna de sus tres líneas celulares.

##### **5. Antecedentes en el cultivo *in vitro* de *Taxus* sp.**

Como se mencionó anteriormente, existen diversas publicaciones que reflejan los esfuerzos realizados en varias especies del género *Taxus* para la obtención de paclitaxel o algún otro taxano bajo condiciones *in vitro*, en la tabla 11 aparecen algunas de éstas. A pesar de que no se incluyen en la tabla, por los objetivos del presente trabajo, cabe mencionar que los estudios realizados sobre este grupo de plantas no se enfocan exclusivamente a su aprovechamiento farmacéutico sino

también a su regeneración y propagación *in vitro*, pues son especies protegidas por normas ecológicas.

**Tabla 11.** Algunas contribuciones en el cultivo *in vitro* de *Taxus sp.* para la obtención de paclitaxel.

Referencia	Especie	Contribución
Luo <i>et al.</i> , 2001	<i>Taxus chinensis</i>	La adición de 5 mgL <sup>-1</sup> de ABA en cultivos en suspensión establecidos a partir de callos inducidos de tallos jóvenes, incrementaron la acumulación de paclitaxel a 11 mgL <sup>-1</sup> , 5 veces más que el control. En combinación con 20 mgL <sup>-1</sup> de metil jasmonato se obtuvo 18 mgL <sup>-1</sup> .
Khosroushahi <i>et al.</i> , 2005	<i>Taxus baccata</i>	Utilizaron AgNO <sub>3</sub> (0.3 mgL <sup>-1</sup> ) como un inhibidor del etileno que puede promover la producción de Taxol.
Barrios <i>et al.</i> , 2009	<i>Taxus globosa</i>	Al adicionar 0.5 mgL <sup>-1</sup> de cloruro de clorocolina en cultivos celulares provenientes de brotes maduros, lograron un rendimiento de 0.0269 mg g <sup>-1</sup> de peso seco, 9.6 veces más que el control. Relacionaron la actividad de la polifenol oxidasa (PPO) con la productividad de taxol.
Yukimune <i>et al.</i> , 1996	<i>Taxus media</i> <i>Taxus baccata</i> <i>Taxus brevifolia</i>	Incrementaron significativamente la producción de paclitaxel y baccatina III en cultivos celulares de <i>Taxus spp</i> provenientes de tallos jóvenes y semillas, al exponerlos a 100 µM de metil jasmonato.
Furmanowa <i>et al.</i> , 1997	<i>Taxus x media</i> <i>var. Hatfieldii</i>	El picloram, a diferencia de otras auxinas, incrementó el crecimiento del callo pero no la producción de taxanos, la incubación en fotoperiodo también favoreció la proliferación. La adición de 100 µM de metil jasmonato incrementó el contenido de paclitaxel de 2.37 µg g <sup>-1</sup> a 90 µg g <sup>-1</sup> de peso seco.
Ketchum <i>et al.</i> , 1999	<i>Taxus canadensis</i> <i>Taxus cuspidata</i>	En respuesta a la elicitación con 200 µM de metil jasmonato, la producción de paclitaxel y otros taxanos se optimizó significativamente.
Wu y Ge, 2004	<i>Taxus chinensis</i>	En cultivos celulares derivados de tallos jóvenes aplicaron ultrasonido de baja frecuencia para provocar estrés oxidativo y la acumulación de ácido jasmónico, lo cual estimuló la producción de taxol.
Mirjalili y Linden, 1996	<i>Taxus cuspidata</i>	Sometieron líneas celulares de <i>T. cuspidata</i> a varias concentraciones y combinaciones de metil jasmonato y etileno para incrementar la productividad de taxol, encontraron actividad sinérgica con 5 ppm de etileno y 10 µM de metil jasmonato a las 51 h después de la elicitación. El etileno concentrado a 50 ppm inhibió la producción de taxol.

---



---

Yukimune <i>et al.</i> , 2000	<i>Taxus media</i>	Probaron el efecto sobre la producción de paclitaxel y baccatina III de todos los estereoisómeros de metil jasmonato. Encontraron diferencias, donde la óptima configuración fue (3R, 7R)-MJA la cual promovió la producción de ambos taxanos al tiempo que inhibió el crecimiento celular.
Ketchum y Gibson, 1996	<i>Taxus canadensis</i> <i>Taxus cuspidata</i>	Evaluaron el efecto de carbohidratos y varios reguladores de crecimiento sobre el crecimiento celular y la producción de paclitaxel de cinco líneas celulares. Reconocen que la combinación de éstos en el medio de cultivo será diferente según la línea celular de que se trate: la combinación de NAA y tidiazuron en <i>T. canadensis</i> , mientras que en <i>T. cuspidata</i> IAA y BA presentaron mejores resultados. La mezcla de sacarosa y fructosa incrementaron el crecimiento y con ello la acumulación de paclitaxel, cuyos niveles más altos fueron $14.78 \pm 0.86 \text{ mgL}^{-1}$ .
Wang <i>et al.</i> , 2004	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	Analizaron teórica y experimentalmente el incremento de taxol y otros taxanos por efecto del MeJA y el ácido salicílico (SA), el MeJA incrementó significativamente la producción de taxol, mientras que el SA incrementó la producción de cefalomanina.

---

El uso de metabolitos secundarios de origen vegetal como medicamentos, tiene su principal fuente en las poblaciones silvestres, pero su extenso y excesivo consumo trae consigo graves consecuencias en la destrucción de los hábitats, pérdida de biodiversidad y por tanto de variabilidad genética. El cultivo de tejidos vegetales bajo condiciones controladas, es una opción viable que ofrece la oportunidad de superar algunos problemas inherentes a los extractos herbarios, o mejor aún, puede ser el medio para mejorar rasgos agronómicos y medicinales (Canter *et al.*, 2005).

Esta técnica ha dado buenos resultados en el cultivo de varias especies del género *Taxus*, sin embargo, de *Taxus globosa* quien posee un elevado potencial para la producción de paclitaxel se tienen escasos trabajos al respecto.

El presente estudio forma parte de un proyecto interdisciplinario cuyo objetivo final es optimizar la producción de paclitaxel en cultivos *in vitro* de *Taxus globosa*, de tal manera que sin desvincularnos del aprovechamiento de su producto, se evite el deterioro del recurso vegetal. Resultando substancial desde el punto de vista biotecnológico y ecológico.

### OBJETIVO GENERAL

Optimizar las condiciones de cultivo *in vitro* para la inducción y mantenimiento de callo y células en suspensión de *Taxus globosa*, elicitar y analizar cualitativamente la producción de paclitaxel y otros taxanos.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Inducir y mantener cultivos de callo a partir de dos tipos de explantes, tallo y acículas de *T. globosa*, incubados bajo dos condiciones, fotoperiodo y oscuridad, y bajo diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ .
- Seleccionar las mejores condiciones de cultivo al considerar parámetros como el crecimiento y el nivel de oxidación.
- Establecer con el tratamiento seleccionado cultivos celulares en suspensión y elicitarlos con Metil Jasmonato (MeJA).
- Analizar cualitativamente la producción de paclitaxel y otros taxanos por Cromatografía en Capa Fina y por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr los objetivos planteados, el trabajo se realizó en dos etapas (figura 9). La primera de ellas se llevó a cabo bajo la dirección de la M. en C. María Teresa de Jesús Olivera en el laboratorio 116 del departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, a excepción del punto I.b. que se llevó a cabo en el área de Fisiología y Tecnología Postcosecha Hortofrutícola del Colegio de Posgraduados con ayuda de la M. en C. Cecilia García Osorio.

La segunda etapa se hizo en los laboratorios 104 y 111 del departamento de Bioquímica y Farmacia, respectivamente, de la Facultad de Química, UNAM, bajo la instrucción de la Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo y el Dr. José Fausto Rivero Cruz.

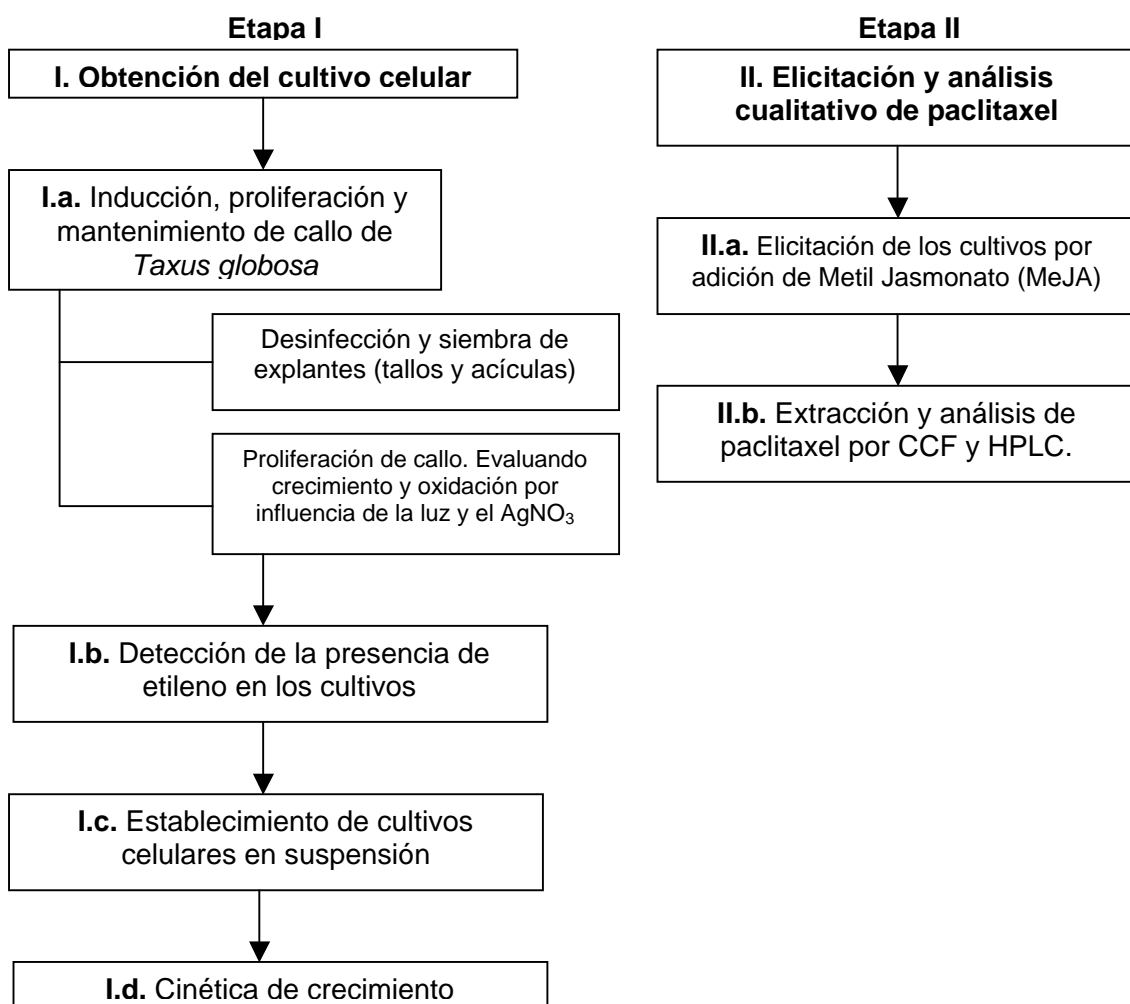


Figura 9. Diagrama metodológico

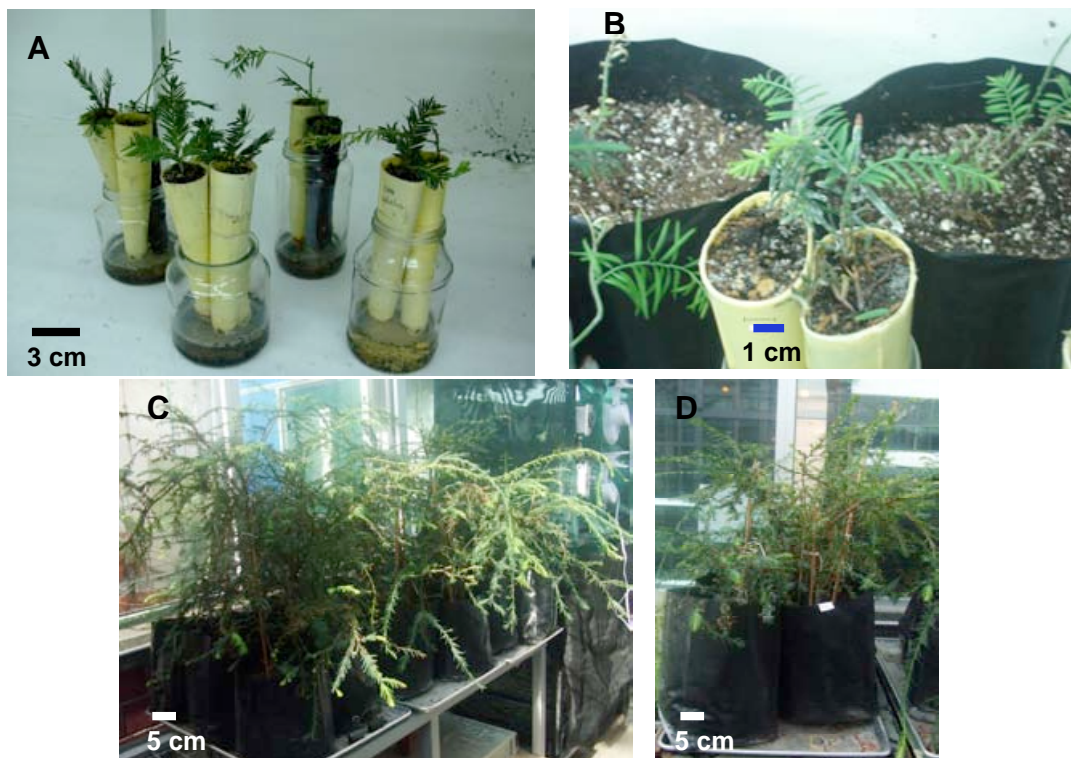
---

---

## Etapa I. Obtención del cultivo celular.

### I.a. Inducción, proliferación y mantenimiento de callo de *T. globosa*.

El material biológico para iniciar el cultivo consistió en acículas y tallos jóvenes de *T. globosa*, obtenidos a partir de brotes nuevos de estacas establecidas a partir de individuos silvestres, donadas al conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Coyoacán) (figura 10). Éstas se mantuvieron en el invernadero del conjunto E, regadas dos veces por semana y una vez al mes se agregó al sustrato una solución de sales MS (ver anexo I) al 40%, más vitaminas R2 10% (ver anexo II), glicina ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y BAP ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ), sin azúcar, para la inducción de nuevos brotes.



**Figura 10.** Estacas de *T. globosa* establecidas y donadas por el INIFAP. A y B) Recién donadas; C y D) Después de 3 años de mantenimiento e inducción de brotes.

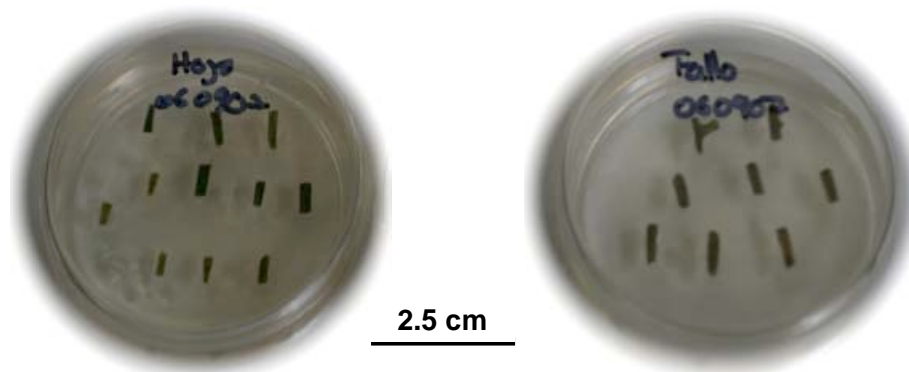
Los explantes jóvenes se identificaron por su color verde claro, se seccionaron de la planta madre e inmediatamente fueron desinfectados siguiendo el protocolo descrito en la tabla 12, modificado a partir del reportado por Arandal (2009) y



llevado a cabo en su totalidad en un ambiente aséptico, dentro de una campana de flujo laminar.

**Tabla 12.** Protocolo de desinfección (todo se realizó en condiciones asépticas).

<b>Solución desinfectante</b>	<b>Tiempo</b>
Detergente común	10 min
Vanish® 4 g L <sup>-1</sup>	20 min
Solución de Cloro al 15% v/v + Tween 20 (3 gotas/250ml) + Microdyn® (5ml/250ml)	20 min
Enjuague con agua destilada y esterilizada	1 min
Agrimicin® 4 g L <sup>-1</sup>	45 min
Captan® 4 g L <sup>-1</sup>	30 min
Benomil® 4 g L <sup>-1</sup>	45 min
4 enjuagues con agua destilada y esterilizada	1 min c/u
Enjuague + Antibiótico (Cefotaxime 250 mg L <sup>-1</sup> )	Directo a siembra



**Figura 11.** Siembra de explantes de acículas (izquierda) y tallos (derecha)

Al sembrar, los explantes se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, ésto bajo inmersión en la última solución desinfectante con antibiótico, además, en el caso de acículas se cortaron los bordes y se hicieron pequeñas heridas con el bisturí en la superficie del haz y el envés, mientras que los tallos fueron cortados longitudinalmente exponiendo el cambium vascular al medio de cultivo. Se utilizaron cajas Petri de 5.5 cm de diámetro conteniendo 20 ml del medio de cultivo y se sembraron de 8 a 10 explantes por caja (figura 11).

La composición del medio de cultivo se describe en la tabla 13 y está basado en el medio de cultivo Tax-2 descrito por Arandal (2009), que a su vez es una modificación del publicado por Ketchum *et al.* (1995).

**Tabla 13.** Composición del medio de cultivo para la inducción y proliferación de callos a partir de tallos y acículas de *T. globosa*.

Componente	Concentración
*Sales B5 (Gamborg <i>et al.</i> , 1968)	100 %
*Vitaminas Kao & Michayluk®	100 %
*Vitaminas Nitsch	100 %
Arginina	0.175 g L <sup>-1</sup>
Glicina	0.072 g L <sup>-1</sup>
Prolina	0.112 g L <sup>-1</sup>
Ácido aspártico	0.127 g L <sup>-1</sup>
Picloram	1 mg L <sup>-1</sup>
Kinetina	1.1 mg L <sup>-1</sup>
PVP	1 g L <sup>-1</sup>
Azúcar	30 g L <sup>-1</sup>
Gelificante (Gellan®)	3 g L <sup>-1</sup>
pH	5.7

\* Ver anexos I y II respectivamente

El medio de cultivo se esterilizó por calor húmedo en autoclave vertical a 121°C y 1.2 Kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 18 minutos. Una vez esterilizado, dentro de un ambiente aséptico, se le adicionó antibiótico (Cefotaxime 250 mg L<sup>-1</sup>) y nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) en diferentes concentraciones (tabla 14), este último se preparó en una solución stock de 10 mg / 50 ml y fue esterilizada por filtración con una membrana de 0.2 µm.

**Tabla 14.** Tratamientos con AgNO<sub>3</sub>

Tratamiento	T <sub>0</sub> (control)	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
AgNO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0	1	2	3

La mitad de los cultivos se mantuvieron en oscuridad y la mitad restante en fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, a 24 ± 2°C. El subcultivo se

---

---

realizó cada 3 semanas al mismo medio de cultivo y al tercero se eliminó el antibiótico y se retiró el tejido madre dejando sólo el callo producido a partir de éste.

Posteriormente, el callo producido fue subcultivado para su proliferación, en viales de 2 cm y 1 cm de diámetro con 15 ml de medio de cultivo. Para comparar el crecimiento de los callos por influencia de la concentración de  $\text{AgNO}_3$ , el tipo de explante y la condición de incubación (oscuridad o fotoperiodo), se inoculó la misma cantidad de callo (0.7 g) en los viales y se hicieron 4 repeticiones para cada variante, al cabo de un mes se comparó la ganancia de biomasa en cada uno de los cultivos.

El nivel de oxidación fue medido cualitativamente estableciendo una escala porcentual de acuerdo a la apariencia del cultivo (tabla 15).

**Tabla 15.** Escala cualitativa del porcentaje de oxidación en los cultivos.

<b>Porcentaje de oxidación</b>	<b>Apariencia del cultivo</b>
0%	Nada oxidado: Callo color claro (verde o blanquisco según la condición de incubación), medio de cultivo traslúcido.
25%	Poco oxidado: Callo con pocas secciones de color café claro, medio de cultivo traslúcido.
50%	Medianamente oxidado: Callo de color café oscuro, medio de cultivo café claro.
75%	Muy oxidado: Callo de color café oscuro, medio de cultivo rojizo a café oscuro.
100%	Extremadamente oxidado: Callo de color café oscuro a negro, medio de cultivo café oscuro.

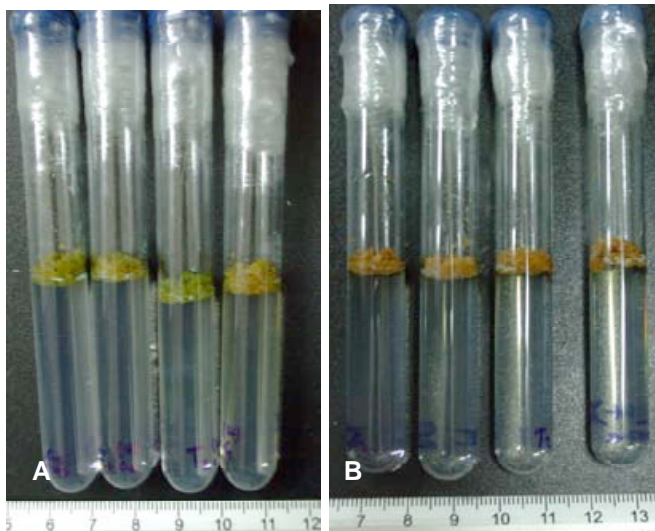
#### **I.b. Detección de la presencia de etileno en los cultivos**

Del callo generado y mantenido en proliferación, se tomaron muestras en tubos Vacutainer (Brand<sup>®</sup>) de 7 ml, con 4 ml de medio de cultivo y 0.2 g de callo para cada uno de los tratamientos, los tubos fueron herméticamente sellados con parafina y mantenidos en las mismas condiciones de incubación (figura 12). En estos cultivos se realizó cromatografía de gases con la finalidad de comparar la presencia de etileno en los cultivos, ya que este gas está involucrado con el

---

envejecimiento celular y por tanto con la proliferación de los cultivos y de acuerdo a las referencias es un agente importante en la producción *in vitro* de taxanos.

Este procedimiento se llevó a cabo con un Cromatógrafo HP5890 Series II, presión 10 psi; detector FID, estándar de etileno de 20 ppm, una columna de silica gel con película de relleno (PORAPLO Q) de 0.32 mm / 25 m.



**Figura 12.** Cultivos de callo en tubos Vacutainer. A) Cultivos incubados en fotoperiodo; B) Cultivos incubados en oscuridad.

### **I.c. Establecimiento de cultivos celulares en suspensión.**

A partir de los datos obtenidos, se seleccionó el tratamiento con menor nivel de oxidación y mayor grado de proliferación y a partir de éste se inocularon 2 g de callo en matraces Erlenmeyer de 50 ml con 15 ml de medio de cultivo líquido para establecer cultivos en suspensión.

En un primer ensayo se probó el medio de cultivo reportado por Arandal (2009), compuesto por sales SH (ver anexo I), PVP ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), azúcar ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) y como reguladores de crecimiento ANA ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), 2,4-D ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y BAP ( $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ ), finalmente y debido a los resultados obtenidos, el medio de cultivo utilizado se describe en la tabla 16.

**Tabla 16.** Composición del medio de cultivo para células en suspensión, pH = 5.7.

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
*Sales B5 (Gamborg <i>et al.</i> , 1968)	100 %
*Vitaminas Kao & Michayluk®	100 %
*Vitaminas Nitsch	100 %
Arginina	0.175 g L <sup>-1</sup>
Glicina	0.072 g L <sup>-1</sup>
Prolina	0.112 g L <sup>-1</sup>
Ácido aspártico	0.127 g L <sup>-1</sup>
ANA	2.5 mg L <sup>-1</sup>
AIA	2.5 mg L <sup>-1</sup>
AIB	2.5 mg L <sup>-1</sup>
BAP	1 mg L <sup>-1</sup>
PVP	10 g L <sup>-1</sup>
Azúcar	15 g L <sup>-1</sup>

\*Ver anexos I y II respectivamente

Se manejaron cultivos cerrados, es decir, se agregó medio fresco y se eliminó un poco del medio viejo en cada subcultivo realizado cada 15 días, se conservó la densidad celular para que ésta proliferara. Se mantuvieron en agitación constante de 100 a 140 rpm durante 3 meses.

#### **I.d. Cinética de crecimiento de los cultivos en suspensión.**

Para la cinética de crecimiento se filtró al vacío el medio de cultivo y se cosechó la biomasa, antes de filtrar se tomó el peso del papel filtro y éste se discriminó al final para obtener el peso fresco de la biomasa, la cual se dejó secar durante 3 días para obtener el peso seco.

Los datos se tomaron cada cuatro días con tres repeticiones, a lo largo de 28 días.

---

---

## **Etapa II. Elicitación y análisis de taxanos.**

### **II.a. Elicitación de los cultivos por adición de Metil Jasmonato (MeJA).**

Se preparó una solución stock de 21 mM de MeJA (Aldrich 392707) disuelta en etanol, mantenida en frasco ámbar y esterilizada por filtración (0.2  $\mu\text{m}$ ).

A los 7 días del ciclo de crecimiento de los cultivos en suspensión se adicionó 100  $\mu\text{M}$  de MeJA a la mitad de los cultivos, a la otra mitad se les agregó sólo etanol para utilizarlos como controles. A los 16 días del ciclo (fase estacionaria) los cultivos fueron detenidos separando el medio de cultivo de la masa celular por centrifugación a 2500 rpm durante 15 min, se decantó el sobrenadante y se volvieron a centrifugar, tanto el medio de cultivo como la masa celular se congelaron con nitrógeno líquido para ser liofilizados.

### **II.b. Obtención de extractos y análisis de paclitaxel por CCF y HPLC.**

El análisis fitoquímico se orientó a la identificación cualitativa de paclitaxel, cefalomanina y brevifoliol. La metodología se hizo con base a Srinivasan y Muthumary (2009).

Las células congeladas se liofilizaron y una vez secas se maceraron y extrajeron con dos tipos de disolventes por separado, acetato de etilo y metanol, durante 72 h cada uno, lo mismo se hizo con los medios de cultivo. Al cabo de este tiempo se obtuvieron los extractos y se concentraron en un rotavapor.

Los estándares para el análisis cromatográfico consistieron en paclitaxel (Sigma life science T7402) y dos mezclas de taxanos, paclitaxel+cefalomanina y paclitaxel+cefalomanina+brevifoliol, aislados y donados por el Dr. Hector Barrios, del Instituto de Química, UNAM.

El primer análisis se hizo en cromatografía en capa fina (CCF), se utilizaron placas de sílica gel (6F<sub>254</sub> Merck) y como fase móvil una solución de cloroformo:metanol (7:1 v/v), como revelador se usó una solución de vainillina. El análisis consecuente se hizo por HPLC, sólo en aquellos extractos que resultaron positivos a la CCF, utilizando los mismos estándares y siguiendo las condiciones descritas en la tabla 17.

---

---

**Tabla 17.** Condiciones para el análisis de taxanos por HPLC (Srinivasan y Muthumary, 2009)

<b>Condiciones de análisis por HPLC (Shimatzu modelo CTO-10A)</b>	
<b>Columna</b>	C <sub>18</sub>
<b>Fase móvil</b>	MeOH / CH <sub>3</sub> CN / H <sub>2</sub> O 25:35:40
<b>Detector</b>	UV 232 nm
<b>Flujo</b>	1.0 ml min <sup>-1</sup>
<b>Tiempo</b>	20 min
<b>Volumen de inyección</b>	20 µl

Antes del análisis por HPLC, los componentes de la fase móvil fueron filtrados al vacío y sonicados durante 10 min, los extractos concentrados fueron diluídos en 200 µl en MeOH grado HPLC y filtrados con una membrana de 0.45 µm.

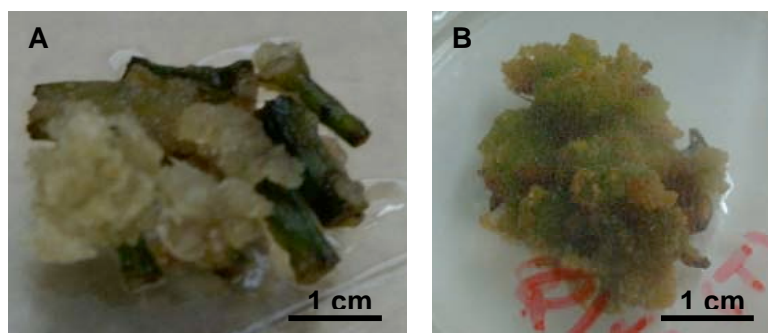
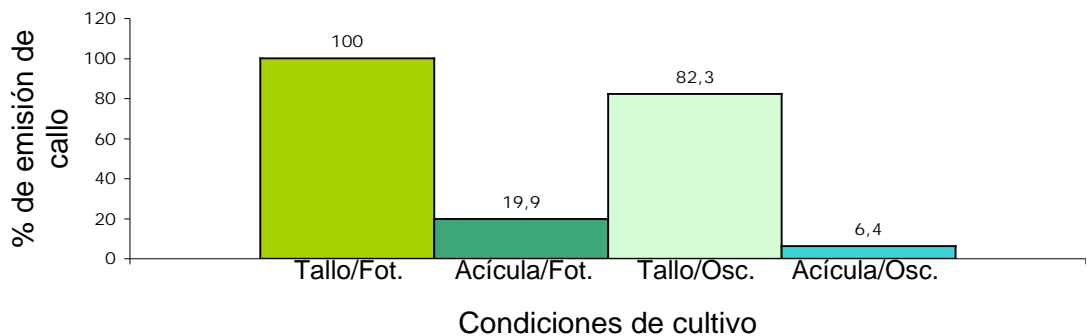
El porcentaje de taxol por peso seco se calculó al comparar las unidades de absorbancia de las muestras con la del estándar comercial y se extrapoló a la concentración conocida de éste, considerando la dilución del extracto en MeOH y la masa total de tejido de donde se obtuvo.

**Etapa I. Obtención del cultivo celular.**

**I.a. Inducción, proliferación y mantenimiento de callo de *T. globosa*.**

La contaminación global fue mínima, del 0 al 5% por hongos. Ambos explantes, tallos y acículas, respondieron positivamente a la inducción de callo pero a diferentes tiempos, la emisión de callo en los tallos inició aproximadamente 15 días después de la siembra y se generó a lo largo de toda la superficie del tallo aunque en mayor cantidad en los extremos y cerca del cilindro vascular (figura 13), mientras que en las acículas la respuesta se obtuvo alrededor de los 29 días, éstas se hincharon y generaron callo a partir de la zona intermedia del haz y el envés. Dichos resultados se dieron de manera independiente a la concentración de  $\text{AgNO}_3$ , pero dependientes del fotoperiodo (gráfica 1).

**Gráfica 1. Porcentaje de formación de callo por explante y condición de incubación, a un mes de la inducción**



**Figura 13.** Callo generado en explantes de tallo, después de tres semanas de su inducción: A) incubados en ausencia de luz; B) incubados en fotoperiodo.

A pesar de la lenta respuesta de las acículas para la formación de callo, éste resultó más prolífero, en la tabla 18 se observa dicho grado de proliferación

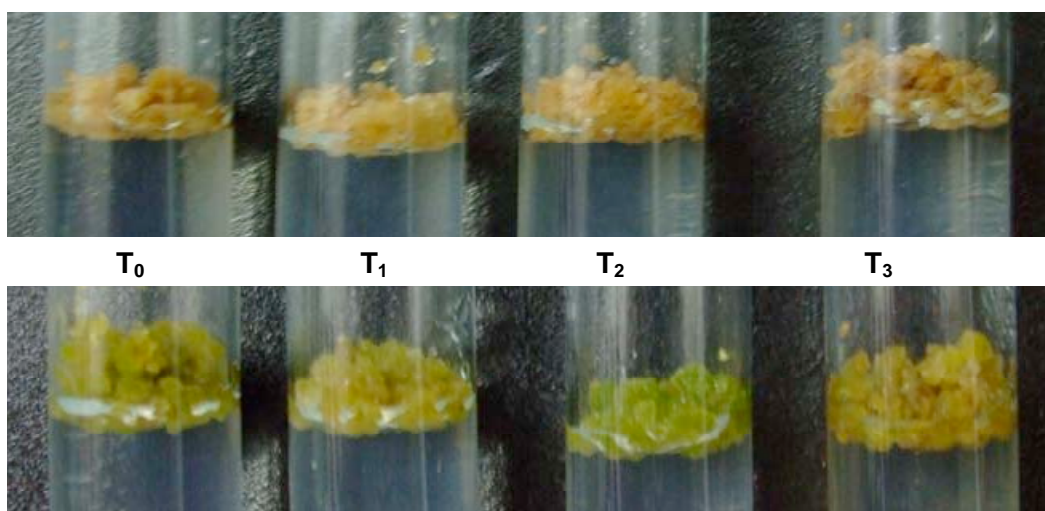


reflejado al comparar la ganancia de biomasa en los cultivos durante un mes, así mismo, los callos incubados en fotoperiodo presentaron mayor crecimiento y coloración verde (figura 14) por la diferenciación de cloroplastos, observados en microscopio. Fuera de estas diferencias, el callo generado bajo cualquiera de las condiciones de cultivo era friable e hidratado.

**Tabla 18.** Ganancia promedio de biomasa (peso fresco) en un mes, tratamiento control ( $T_0$ ).

Oscuridad		Fotoperiodo N = 4	
Callos de		Callos de	
Tallo	Acículas	Tallos	Acículas
0,33 g	<b>0,475 g</b>	0,3375 g	<b>0,625 g</b>

N = 4 en cada caso

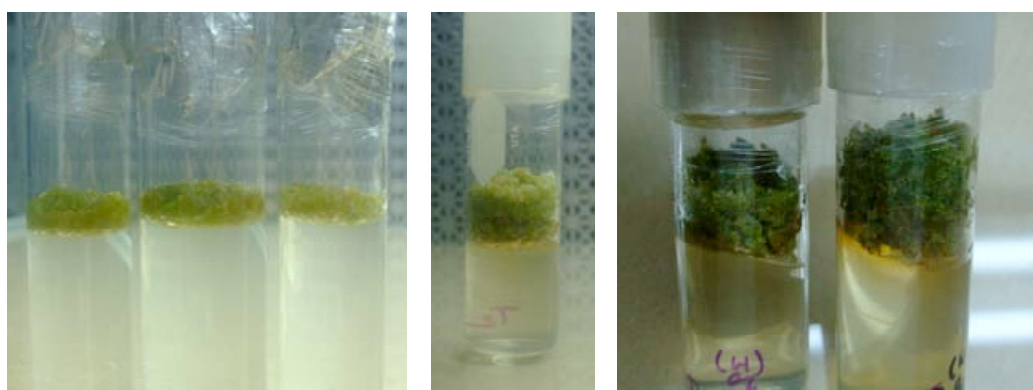


**Figura 14.** Callos incubados en oscuridad (superior) y en fotoperiodo (inferior). Los callos incubados en fotoperiodo diferenciaron cloroplastos.

Las diferentes concentraciones de  $AgNO_3$  también influyeron sobre el nivel de oxidación (tabla 19) y sobre la ganancia de biomasa que constantemente fue más elevada con el tratamiento  $T_2$  con  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de esta sal; con la concentración menor y mayor de  $AgNO_3$ ,  $T_1$  y  $T_3$  respectivamente, el nivel de proliferación siempre fue bajo (gráficas 2 y 3). La mayor ganancia de biomasa registrada al cabo de un mes fue 0.71 g en el cultivo de callo proveniente de acículas incubado en fotoperiodo y en el tratamiento  $T_2$  (gráfica 2 y figura 15).

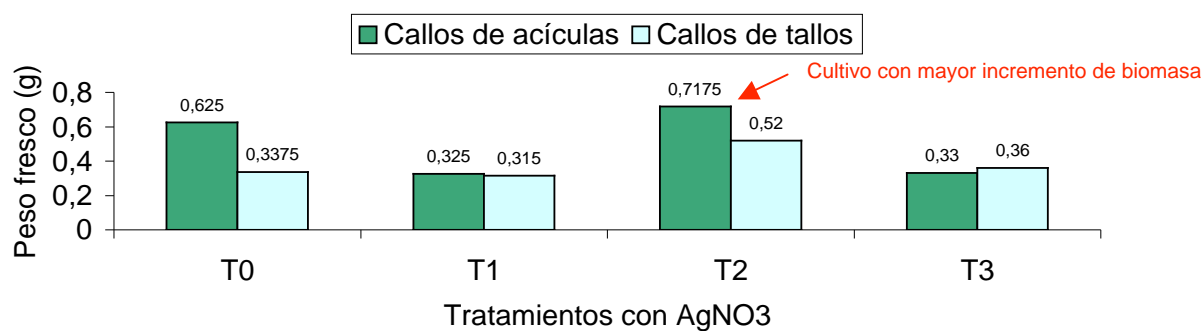
**Tabla 19.** Porcentaje de oxidación en los callos.

Tratamiento	[AgNO <sub>3</sub> ]	% de oxidación
T <sub>0</sub>	0 mg L <sup>-1</sup>	26.35
T <sub>1</sub>	1 mg L <sup>-1</sup>	34.95
<b>T<sub>2</sub></b>	<b>2 mg L<sup>-1</sup></b>	<b>24.7</b>
T <sub>3</sub>	3 mg L <sup>-1</sup>	34.35

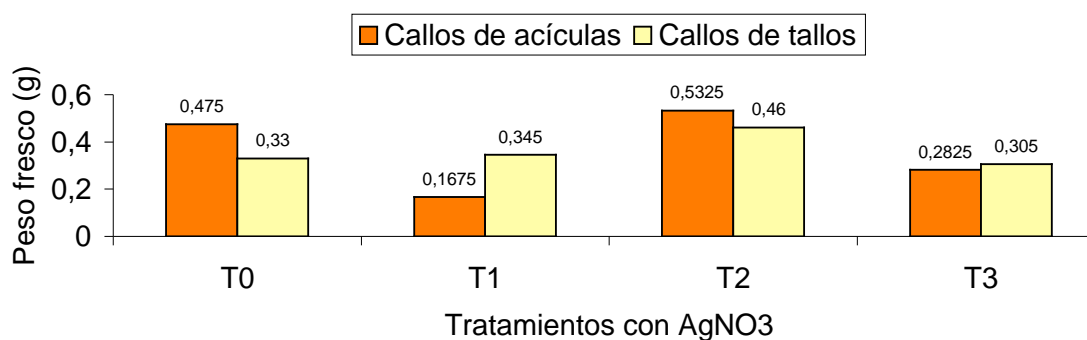


**Figura 15.** Cultivo de callo más prolifero, proveniente de acículas e incubado en fotoperiodo y en el tratamiento T<sub>2</sub>, a diferentes tiempos del ciclo de crecimiento.

**Gráfica 2.** Ganancia promedio de biomasa en un mes, en cultivos de callo en fotoperiodo. N = 4



**Gráfica 3.** Ganancia promedio de biomasa en un mes, en cultivos de callo en oscuridad. N = 4



---

Considerando el menor nivel de oxidación y la elevada proliferación del callo proveniente de acículas en el tratamiento  $T_2$  en fotoperiodo, se seleccionó a éste para el establecimiento de cultivos en suspensión.

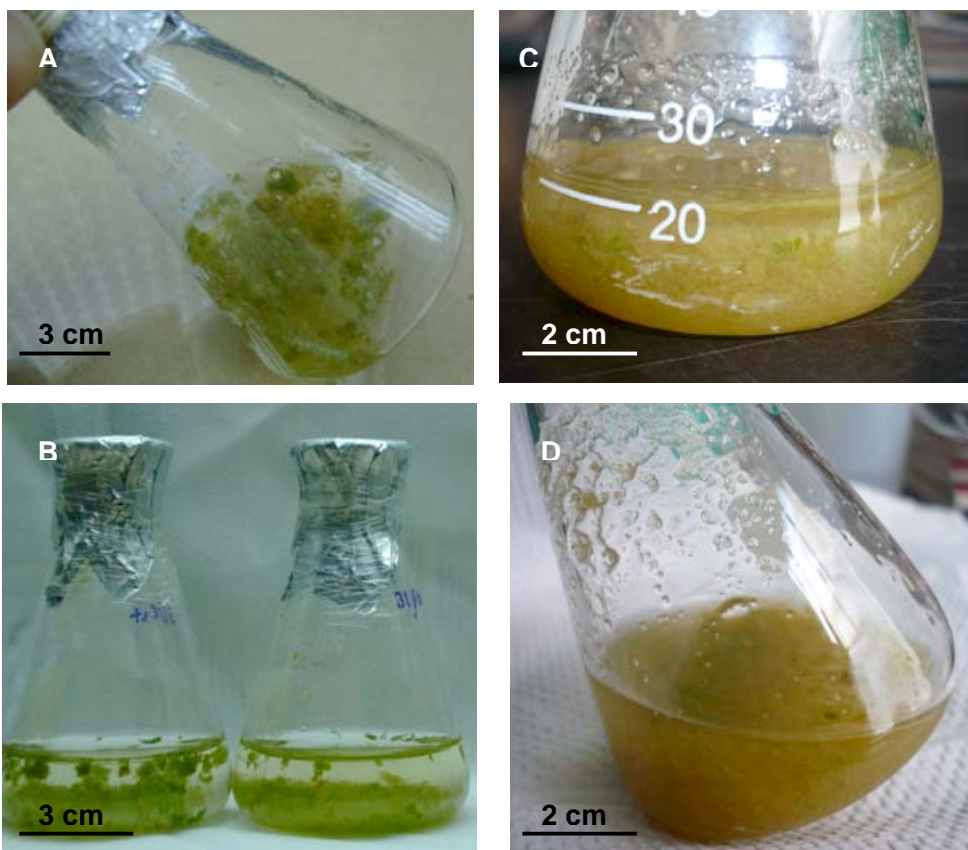
### I.b. Detección de la presencia de etileno en los cultivos

El análisis preliminar por cromatografía de gases reveló la posible abundancia de etileno en el microambiente de los cultivos  $T_0$  (control) y  $T_2$ , sin embargo, es necesario afinar la metodología en este paso pues se obtuvieron algunos picos sobrepuestos en el cromatograma que limitaron una interpretación más precisa.

### I.c. Establecimiento de cultivos celulares en suspensión

Es importante mencionar que el callo utilizado para establecer los cultivos en suspensión fue mantenido en proliferación cerca de 2.5 años.

Los mejores resultados en cuanto al menor grado de oxidación durante el mantenimiento de células en suspensión se obtuvieron en el ensayo 2 (figura 16), medio de cultivo que incluía ANA, AIA, AIB y BAP con sales B5 (ver tabla 16).



**Figura 16.** Cultivos celulares en suspensión de *T. globosa*, inoculados en medio con sales B5, a partir de  $T_2$ -acículas-fotoperiodo, en diferentes etapas del ciclo de crecimiento: fase exponencial (A y B) y fase estacionaria (C y D).

---

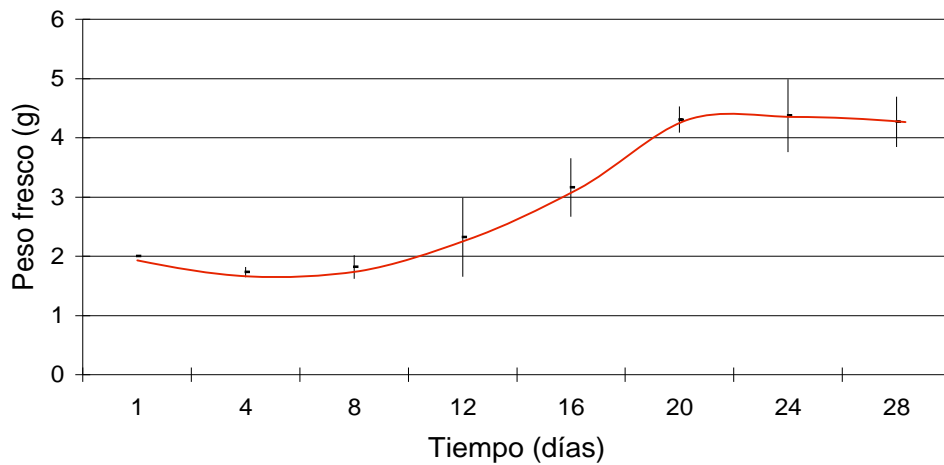
---

Con el primer ensayo, sales SH con ANA, 2,4-D y BAP, no pudieron hacerse más evaluaciones pues se oxidaba por completo después del primer subcultivo.

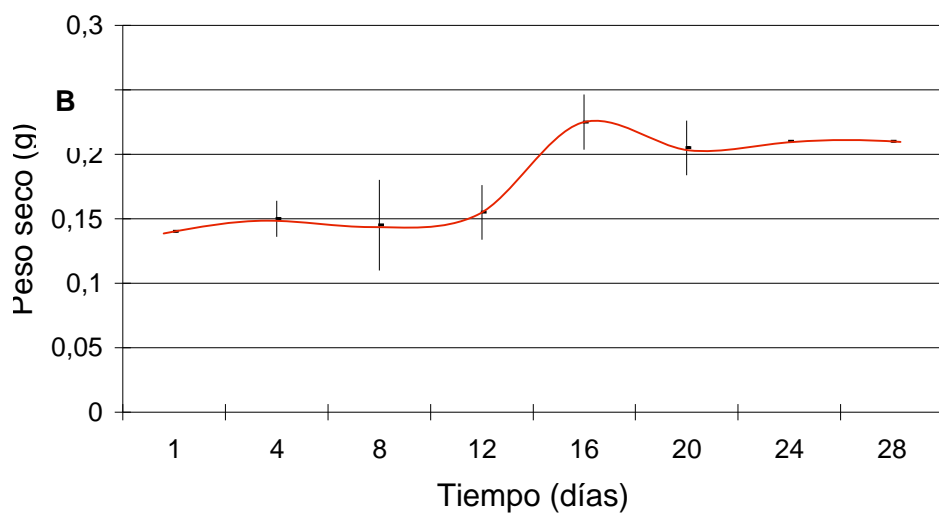
### I.c. Cinética de crecimiento de los cultivos en suspensión

La cinética de crecimiento indicó el inicio de la fase estacionaria entre los días 16 (gráfica 5) y 20 (gráfica 4), prolongándose hasta el día 28, días adecuados para el análisis de taxanos dado que el crecimiento disminuyó y la producción de metabolitos secundarios podría haberse incrementado.

**Gráfica 4. Cinética de crecimiento de cultivos en suspensión (peso fresco). N = 3**



**Gráfica 5. Cinética de crecimiento de cultivos en suspensión (peso seco). N = 3**

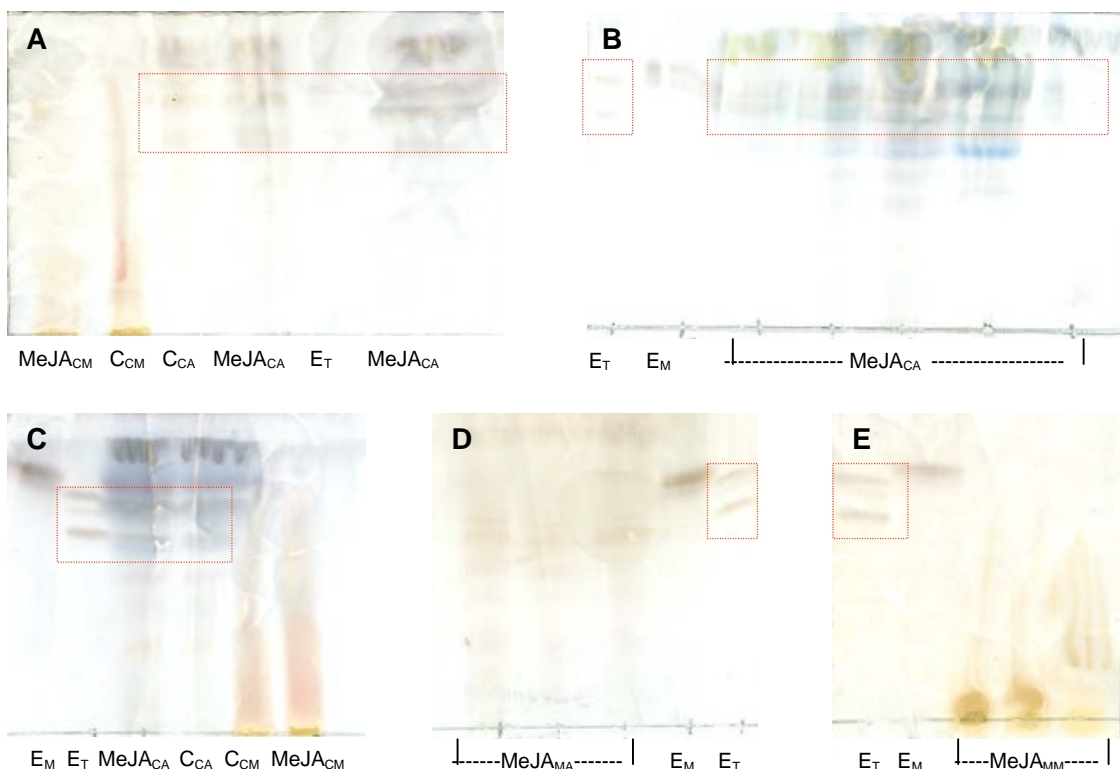


Teniendo como base los resultados de la cinética de crecimiento y las referencias bibliográficas se seleccionó el día 7 del ciclo del cultivo para agregar el MeJA y el día 16 para detener el ciclo y realizar el análisis.

## Etapa II. Elicitación y análisis cualitativo de paclitaxel

### II.b. Extracción y análisis de paclitaxel por CCF y HPLC

El análisis cromatográfico en capa fina reveló la presencia de paclitaxel sólo en los extractos de acetato de etilo de las células, tanto en los controles como en los elicitados con MeJA (figura 17-A, B y C), los extractos provenientes del medio de cultivo resultaron negativos (figura 17-D y E). El metabolito tampoco se encontró en los extractos metanólicos (figura 17-A, C y E), el acetato de etilo resultó el mejor disolvente para la extracción.



**Figura 17.** Placas reveladas de la CCF de los extractos. **E<sub>T</sub>**: estándar de paclitaxel comercial; **E<sub>M</sub>**: estándar de la mezcla de taxanos (paclitaxel+cefalomanina); **MeJA<sub>CM</sub>**: extracto metanólico de las células elicitadas; **C<sub>CM</sub>**: extracto metanólico de las células controles, es decir, sin la adición del elicitador; **C<sub>CA</sub>**: extracto de acetato de etilo de las células controles; **MeJA<sub>CA</sub>**: extracto de acetato de etilo de las células elicitadas; **MeJA<sub>MA</sub>**: extracto de acetato de etilo del medio nutritivo de los cultivos elicitados; **MeJA<sub>MM</sub>**: extracto metanólico del medio nutritivo de los cultivos elicitados.

El análisis por HPLC corroboró la presencia de paclitaxel en los extractos celulares con acetato de etilo, independientemente de que hubieran sido elicitados o no (figura 18), sin embargo, en la estimación porcentual en peso seco de paclitaxel, resultaron más productivos aquellos cultivos que fueron expuestos al MeJA (tabla 20).

Los otros dos taxanos (cefalomanina y brevifoliol) no pudieron identificarse con los estándares que consistían en las mezclas de taxanos en ninguna de las dos metodologías empleadas.

**Tabla 20.** Contenido porcentual de paclitaxel en cultivos celulares de *T. globosa*

Condición de cultivo	% en peso seco, N=5
Control	0.091 ± 0.011401754
Elicitados con MeJA (100 µmol L <sup>-1</sup> )	0.121 ± 0.01711724

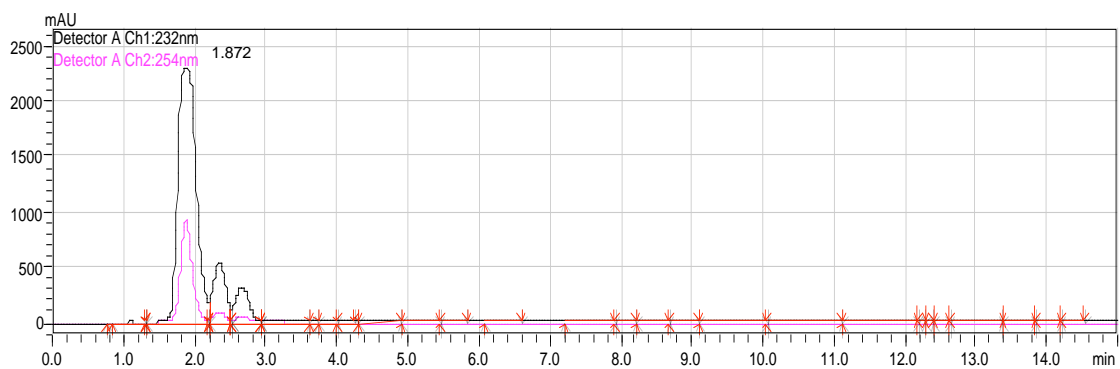
La comparación entre el contenido porcentual de taxol de *Taxus globosa* en este estudio con el de otras especies del género, reportada por Tabata (2004) y Yukimune *et al.* (1996) se muestra en la tabla 21.

**Tabla 21.** Comparación de la producción *in vitro* de paclitaxel en *Taxus sp.* con y sin la adición de metil jasmonato (MeJA).

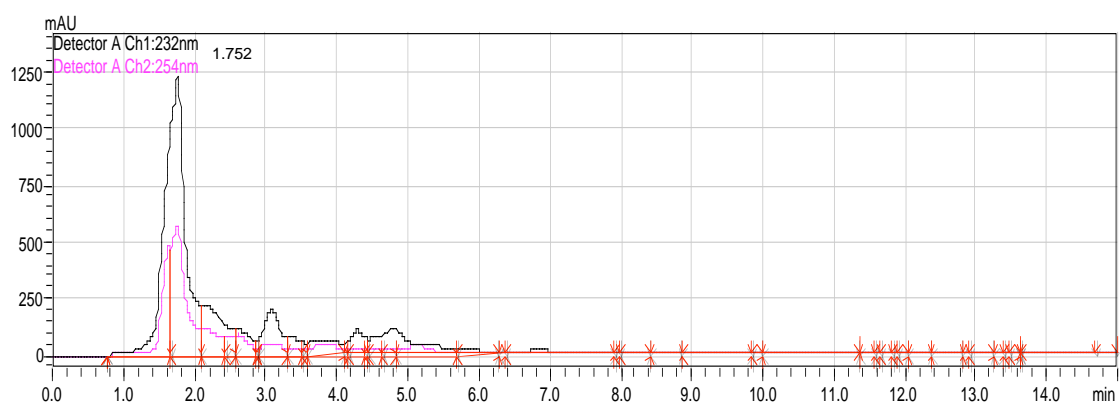
Especie	MeJA (µmol L <sup>-1</sup> )	Paclitaxel (% peso seco)
<i>T. baccata</i> *	0	0.002±0.000
	100	0.229±0.009
<i>T. brevifolia</i> *	0	0.001±0.000
	100	0.004±0.000
<i>T. x media</i> *	0	0.120±0.009
	100	0.606±0.022
<i>T. globosa</i> **	0	0.091± 0.011
	100	0.121±0.0171

\* Tabata, 2004; Yukimune *et al.*, 1996; \*\* Datos obtenidos en esta tesis.

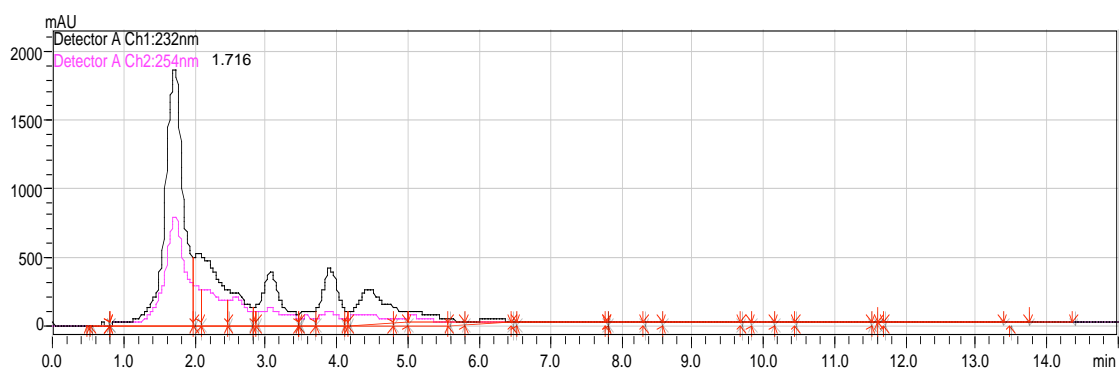
**A**



**B**



**C**



**Figura 18.** Cromatogramas obtenidos mediante el análisis por HPLC. A) Estándar de paclitaxel; B) Extracto del cultivo control; C) Extracto del cultivo elicitado con MeJA ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )

### Etapa I. Obtención del cultivo celular

El establecimiento aséptico de los explantes fue posible no sólo por el enérgico método de desinfección, mantener en “cuarentena” dentro del invernadero el material vegetal también jugó un papel muy importante al permitir un mejor control de los agentes patógenos, en alguna ocasión, cuando se probó el mismo protocolo de desinfección en material proveniente de campo el porcentaje de contaminación aumentó considerablemente (alcanzando del 80 al 100%), ya que los explantes extraídos directamente de su medio natural están en contacto directo con mayor cantidad de agentes contaminantes y en el caso de esta especie, muchos de ellos son sistémicos, razón por la cual en el método de desinfección se utilizaron fungicidas y bactericidas de acción sistémica, Benomilo® y Agrimicin® respectivamente. El resto de los agentes químicos utilizados, contribuyeron significativamente en esta fase actuando de diferentes maneras:

- Vanish®: Su agente activo es el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provoca muerte celular produciendo OH y radicales libres que atacan la membrana celular de los microorganismos. El oxígeno generado a partir de su degradación dificulta la germinación de esporas anaerobias (Fuente: ver página electrónica en la bibliografía).
- Hipoclorito de sodio (NaClO): Actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos de los microorganismos, oxida grupos –SH y ataca grupos aminos e indoles (Fuente: ver página electrónica en la bibliografía).
- Tween 20®: Es un surfactante que al romper la tensión superficial mejora el contacto del cloro con el tejido vegetal (Fuente: ver página electrónica en la bibliografía).
- Microdyn®: Es una suspensión con partículas de plata, las cuales reaccionan con los grupos -SH de las proteínas funcionales y estructurales de las células bacterianas, inhiben su respiración (Arandal, 2009).
- Captan®: Es un fungicida de acción superficial que inhibe la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio (Arandal, 2009).

Como se menciona en los resultados, ambos explantes, tallos y acículas, respondieron positivamente a la inducción de callo, pero a diferentes tiempos, siendo los tallos los de respuesta más temprana. Lo anterior puede tener una explicación anatómica, debido a que los tallos exhiben una mayor cantidad de zonas en continua división celular (meristemos intercalares, laterales y apicales), en



---

---

tanto que las hojas, también llamadas acículas, por su forma delgada a manera de aguja, poseen sólo al cambium vascular como zona meristemática presente en una sola nervadura central característica de gimnospermas. Además, las acículas están cubiertas por una gruesa capa de cutícula que pudo retardar el tránsito de los componentes del medio la formación de callo, de hecho, hacer heridas en la superficie de la epidermis como se mencionó en la metodología, resultó fundamental o de lo contrario la producción de callo no ocurría.

No obstante a los resultados anteriores, durante los subcultivos fue el callo proveniente de acículas el que presentó mayor crecimiento, por lo anterior, las acículas no sólo son el órgano con mayor rendimiento de paclitaxel, de acuerdo a Soto (2000), sino también la mejor opción para la producción de callo en *Taxus globosa* por su elevado nivel de proliferación, cabe resaltar que existen múltiples factores que pudieron interactuar propiciando dicha respuesta, entre ellos el estado fisiológico de la planta madre, pues la inducción de callo se realizó durante la primavera, cuando la producción de follaje está activa. La obtención de callo a partir de este explante en el tejo mexicano no había sido reportada y brinda una importante fuente de producción del metabolito a la par que puede contribuir enormemente a la conservación de la especie.

Independientemente al explante de procedencia, podemos mencionar que la proliferación de callo también se vio influenciada por los siguientes factores.

- A) *Las hormonas de crecimiento.* El picloram en concordancia con Furmanowa *et al.* (1997), Hirasuna *et al.* (1996) y Ketchum *et al.* (1995) es una excelente auxina que favorece el crecimiento de callo en los cultivos de *Taxus sp.* Mientras que la kinetina también es necesaria para que las células se mantengan en una continua división.
- B) *La concentración de AgNO<sub>3</sub>.* Esta sal inhibidora de la acción del etileno, favoreció el incremento de biomasa posiblemente al retardar el envejecimiento celular y con ello disminuir la aceleración de la tasa respiratoria causante del alto nivel de oxidación y muerte celular. El AgNO<sub>3</sub> actúa por medio del ión Ag<sup>+</sup> que bloquea la unión del etileno a su receptor debido a su especificidad como sustituyente del ión Cu<sup>2+</sup>, que el etileno necesita como cofactor, al suplir al cofactor los cambios normales que la proteína debería tener para el ensamblaje no ocurren, de tal manera que se disminuye la afinidad (Taiz y Zeiger, 2006). Específicamente fue la concentración de 2 mgL<sup>-1</sup> con la que se obtuvieron los mejores resultados.

---

---

Los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub>, aún con esta sal, no dieron buenos resultados pues la concentración pudo ser deficiente o tóxica respectivamente, para poder explicar mejor esta respuesta sería conveniente afinar la técnica para la cromatografía de gases que en este trabajo quedo preliminar.

- C) *La incubación en ausencia de luz o en fotoperiodo.* En comparación a los cultivos en oscuridad, los cultivos incubados bajo fotoperiodo presentaron mayor incremento de biomasa. La luz pudo favorecer el crecimiento celular actuando, por un lado, sobre el ciclo celular y por otro, a través de la diferenciación de cloroplastos, los cuales probablemente favorecieron la asimilación de nutrientes y por tanto la obtención de una mayor cantidad de energía almacenada en compuestos orgánicos, formados a partir de compuestos inorgánicos de baja energía. Muchas de estas reacciones de asimilación ocurren en el estroma del cloroplasto mediante un proceso conocido como fotoasimilación (Taiz y Zeiger, 2006). En el ciclo celular los factores extracelulares, como nutrimentos, determinan si una célula quiescente (G0) comenzará a proliferar y también si una célula normal proliferante en G1 continua al ciclo o regresa a la quiescencia (Pardee, 1989). El ciclo celular y desarrollo en plantas difiere de otros eucariotes, pues por su forma de vida sésil, responden a una gran variedad de señales incluyendo la luz, la temperatura, los nutrientes, la gravedad, etc. (Bryant y Chiatante, 1998).

El cultivo de esta especie presentó un elevado grado de oxidación debido a la liberación de sustancias fenólicas, por lo que además del uso de AgNO<sub>3</sub>, la adición de antioxidantes en el medio de cultivo, como el PVP y las vitaminas Kao & Michayluk<sup>®</sup>, así como el uso de recipientes de poco volumen y una elevada densidad celular en los subcultivos fueron buenas estrategias para el control de la oxidación, previamente probadas por Arandal (2009). La acción antioxidante del PVP se debe a su afinidad como adsorbente de fenoles, las vitaminas Kao & Michayluk<sup>®</sup> se componen entre otras cosas de compuestos antioxidantes, como la vitamina A, que reduce los efectos nocivos de los radicales libres, mientras que un recipiente de poco volumen con alta densidad celular contribuye al contener un menor volumen de aire y con ello una menor concentración de oxígeno disponible.

Al establecer los cultivos en suspensión en el ensayo 1, con medio basal SH y con 2,4-D, las células presentaron un grado extremo de oxidación, debido probablemente a que el cultivo se sometió a demasiado estrés provocado por un

---

---

cambio repentino de sales nutritivas poco concentradas del medio B5 a un medio nutritivo más concentrado, el medio SH. La presencia de 2,4-D también pudo favorecer la oxidación, pues es una auxina sintética que originalmente se usaba como herbicida (Teale, 2006), en el CTV se ha demostrado que puede inducir defectos en el desarrollo y crecimiento de los cultivos (Dal Bosco *et al.*, 2010).

Así, mantener los cultivos en suspensión en el mismo medio nutritivo (B5) pero cambiando los reguladores de crecimiento fue una mejor alternativa, es importante mencionar que la razón por la que se sustituyó al Picloram por otras auxinas al establecer los cultivos en suspensión es que autores como Furmanowa *et al.* (1997) mencionan que la síntesis de paclitaxel no se ve favorecida por la presencia de esta auxina.

La cinética de crecimiento de los cultivos en suspensión de *Taxus globosa* exhibió todas las fases de crecimiento en un periodo de 28 días, duplicando su peso fresco aproximadamente a los 20 días, antes de iniciar la fase estacionaria, sin embargo, el peso seco mostró un incremento máximo del 28% de crecimiento, muy por debajo del peso fresco. Se sabe que esta especie se caracteriza por su lento crecimiento, sin embargo, *in vitro* y bajo estas condiciones pudo ser que el gran tamaño del inóculo haya dificultado el incremento de biomasa, limitando la cantidad de nutrientes disponibles para toda la población celular y al nunca disgregarse por completo, los agregados podrían haber interferido con la sincronía del crecimiento celular. No existen referencias comparables de cinéticas de cultivos en suspensión.

## **Etapa II. Elicitación y análisis cualitativo de paclitaxel**

A pesar de que el metanol es el disolvente más reportado en la bibliografía para la extracción de paclitaxel, en los presentes resultados no pudieron identificarse ninguno de los taxanos utilizados como estándares mediante la CCF pues el disolvente acarrea una gran cantidad de componentes, comparado con éste, el acetato de etilo resultó más selectivo y la mejor opción para la extracción del compuesto, la razón probablemente es que este último es un disolvente menos polar y disolvió menos componentes celulares o del medio nutritivo.

Al comparar el contenido porcentual de paclitaxel en peso seco del “tejo” mexicano del estudio de Soto y colaboradores (2000) donde la producción máxima del metabolito fue de  $0.0130 \pm 0.00122\%$  de peso seco a partir de acículas, con la

---

---

producción *in vitro* de este estudio, el resultado reveló un rendimiento 7 veces mayor en los cultivos controles y de hasta 9 veces más en los cultivos elicitados con MeJA (ver tabla 20).

No obstante, al comparar esta producción con cultivos elicitados de otras especies del género, la producción de *T. globosa* aunque fue elevada, no sobrepasó la de *T. baccata* y *T. x media* reportada por Tabata (2004) y Yukimune *et al.* (1996) (ver tabla 21). Lo anterior podría atribuirse al genotipo y a factores epigenéticos, sin embargo, es necesario llevar a cabo más análisis sobre nuestro “tejo” considerando factores como el incrementarse del estrés de las células a largo de toda la fase estacionaria, ocasionado por el déficit de nutrientes. Así, podría encontrarse mayor acumulación del producto en días posteriores al 16, que fue el analizado en esta tesis.

Un problema común en cultivos mantenidos en un periodo prolongado de subcultivos es la pérdida de productividad (Deus-Neumann y Zenk, 1984; Hirasuna *et al.*,1996 ; Morris *et al.*,1989; Sierra *et al.*,1992), sin embargo, los callos utilizados en este estudio siguieron siendo productivos a pesar de haber transcurrido cerca de 2.5 años de su establecimiento *in vitro*.

Finalmente, es importante resaltar la importancia de este estudio al proporcionar nuevos conocimientos sobre el estudio de *T. globosa* y su rendimiento farmacológico en condiciones *in vitro*, sin embargo, se requiere de mayores esfuerzos para mejorar los resultados que aparentemente son menos eficientes que en el caso de otras especies del género, para así poder aprovechar el elevado potencial de esta especie.

- Mejorar la técnica de cromatografía de gases para explicar que sucede con el etileno en los cultivos en relación a la concentración de  $\text{AgNO}_3$ .
- Probar nuevas estrategias, como el uso de medios condicionados, para lograr una mayor y más acelerada proliferación de la biomasa.
- Evaluar el rendimiento de paclitaxel considerando más variantes, como el tiempo de los cultivos desde su desdiferenciación, la presencia o ausencia de luz para corroborar que la obtención de callos con cloroplastos favoreció la producción del metabolito, diferentes concentraciones del elicitador y analizar la producción en tiempos prolongados de la fase estacionaria.

## CONCLUSIONES

---

- Los diversos agentes químicos, fungicidas y bactericidas, así como el mantenimiento del material vegetal en invernadero, fueron buenas estrategias para el establecimiento aséptico de los cultivos que presentaron un bajo porcentaje de contaminación (0 al 5%).
- Los explantes incubados bajo fotoperiodo (16h luz / 8h oscuridad) respondieron más rápido a la formación de callo.
- Ambos explantes, tallos y acículas, respondieron positivamente a la formación de callo pero esta respuesta fue más temprana en los tallos y más lenta en las acículas.
- Una vez formado el callo, el que provenía de acículas presentó mayor crecimiento.
- La incubación del callo en fotoperiodo y la presencia de  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  en el medio favorecieron un mayor incremento de biomasa en los cultivos.
- La concentración de  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  también contribuyó a disminuir la oxidación de los cultivos junto con el PVP ( $1 \text{ gL}^{-1}$ ), las vitaminas antioxidantes Kao & Michayluk<sup>®</sup> ( $10 \text{ mL}^{-1}$ ) y el uso de recipientes de poco volumen.
- Las sales B5 permitieron el establecimiento tanto de callos en cultivos sólidos, como de cultivos de células en suspensión; se utilizó kinetina ( $1.1 \text{ mgL}^{-1}$ ) y picloram ( $1 \text{ mgL}^{-1}$ ) para la inducción y mantenimiento de callo; mientras que para los cultivos en suspensión se usó ANA, AIA y AIB ( $2.5 \text{ mgL}^{-1}$  de cada auxina) en combinación con BAP ( $1 \text{ mgL}^{-1}$ ).
- Se establecieron cultivos en suspensión seleccionando el cultivo con las mejores características, en cuanto a oxidación y crecimiento se refiere, es decir se seleccionó el cultivo de callo proveniente de acículas e incubados bajo fotoperiodo, con cloroplastos diferenciados y expuestos a  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$ .
- Se elicitaron los cultivos en suspensión agregando al medio de cultivo  $100 \mu\text{M}$  de MeJA.
- La curva de crecimiento en peso seco se consideró la más conveniente para tener una mejor aproximación del crecimiento y a partir de ésta se determinó el tiempo para agregar el elicitador (a los 7 días del inicio de la

---

---

curva), así como el tiempo para la extracción y análisis del producto (16 días, durante la fase estacionaria).

- El acetato de etilo en contraste con el metanol, fue seleccionado como el mejor disolvente para la extracción del metabolito.
- Se encontró la presencia de paclitaxel tanto en los cultivos controles como en los cultivos elicitados a través de CCF y CLAR.
- La presencia del elicitor logró incrementar la cantidad del producto.
- El paclitaxel no se encontró excretado en el medio de cultivo.
- El rendimiento de paclitaxel, considerado en porciento de peso seco, fue considerablemente más elevado que el rendimiento de obtenido del extracto herbario reportado por Soto (2000), pero menor al rendimiento *in vitro* de otras especies del género reportadas por Tabata (2004) y Yukimune *et al.* (1996).

**ANEXO I.** Concentración 100% de las sales componentes de los medios basales MS (Murashige & Skoog, 1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968) y SH (Schenk & Hildebrandt, 1972).

Compuesto	Fórmula	MS mgL <sup>-1</sup>	B <sub>5</sub> mgL <sup>-1</sup>	SH mgL <sup>-1</sup>
<b>Macronutrientes</b>				
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	1900	2500	2500
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-----	-----
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440	150	200
Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	370	250	400
Sulfato de amonio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-----	134	-----
Fosfato de sodio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	-----	150	-----
Fosfato de amonio	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-----	-----	300
Fosfato de potasio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-----	-----
<b>Micronutrientes</b>				
Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	16.9	10	10
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8.6	2.0	1.0
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3.0	5.0
Yoduro de potasio	KI	0.83	0.75	1.0
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.2
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.1
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.1
<b>Quelantes</b>				
Sulfato ferroso	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27.8	28.1	15
Na <sub>2</sub> EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> Na <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	37.3	37.4	20



**ANEXO II.** Concentración 100% de las vitaminas R2 (MS modificadas), vitaminas Nitsch y vitaminas Kao & Michayluk®

<b>Compuesto</b>	<b>Fórmula</b>	<b>R2 mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Nitsch mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Kao® mgL<sup>-1</sup></b>
Ácido fólico	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	-----	0.5	40
Ácido L-ascórbico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	-----	-----	200
Ácido nicotínico	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub>	1.0	5.0	-----
Ácido P-aminobenzoico	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	-----	-----	2.0
Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	-----	0.05	1.0
Cloruro de colina	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OHCl	-----	-----	100
Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	-----	2.0	-----
Myo-Inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	100	1000	10000
Nicotinamina	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub>	-----	-----	100
Pentotenato de calcio	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> CaN <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	-----	-----	100
Piridoxina-HCl	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> . HCl	1.0	0.5	100
Riboflavina	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>9</sub> P. 2H <sub>2</sub> O	-----	-----	2.0
Tiamina-HCl	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> OSCl . HCl	2.0	5.0	100
Vitamina A	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O	-----	-----	1.0
Vitamina B12	C <sub>63</sub> H <sub>88</sub> CoN <sub>14</sub> O <sub>14</sub> P	-----	-----	2.0

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Anaya Lang, A.L. (2003). Ecología química. 1a. ed. Plaza y Valdes. Instituto de Ecología, UNAM. México, D.F.
- Arandal Matínez, A. (2009). Producción de células transformadas genéticamente estables de *Taxus globosa*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Arbuck, S.G y Blaylock, B.A. (1995). Taxol : clinical results and current issues in development. Suffness M, ed. Taxol : Science and applications. Boca Raton : CRC Press. 379-415.
- Barkovich, R. y Liao, J.C. (2001). Metabolic engineering of isoprenoids. *Metabolic Engineering* (3) : 27-39.
- Barradas-Dermitz, D.M., Hayward-Jones, P.M., Matas-Rosas, M., Palmeros-Sánchez, B., Platas-Barradas, O.B.J., Velásquez-Toledo, R.F. (2010). *Taxus globosa* S. cell lines: initiation, selection and characterization in terms of growth, and of baccatin III and paclitaxel production. *Biocell* 34(1): 1-6
- Barrios, H.; Zhang, Y.L. ; Sandoval, C.; Xiao, Z.A. (2009). Increase of taxol production in *Taxus globosa* shoot callus by chlorocholine chloride. *The open natural products journal* (2) : 33-37.
- Bryant, J.A. y Chiatante, D. (1998). Plant cell proliferation and its regulation in growth and development. Chichester; E.U.A.
- Canter, P., Thomas, H. y Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology* Vol. 23 No. 4.
- Chávez Ávila, V. (1993). Embriogenesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Chaw, S.M., Long, H., Wang, B.S., Zharkikh, A. y Li, W.H. (1993). The phylogenetic position of Taxaceae based on 18S rRNA sequences. *Journal Molecular Evolution* 37: 624–630.
- Chee, P.P. (1995). Organogenesis in *Taxus brevifolia* tissue cultures. *Plant Cell Reports* 14: 560-565.

- 
- Contreras-Medina, R. y Luna Vega, I. (2001). Presencia de *Taxus globosa* Schlecht. (Taxaceae) en el estado de Chiapas, México. Polibotánica, No. 12, 51-55, 1405-2768, Méx.
- Covantes Torres, Luz María. (2008). Producción de metabolitos secundarios en agregados en suspensión de *Piqueria trinervia*, Cav. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Cruz López, M. del C. (1998). Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Da Cheng, H., Beili, H. y Ling Y. (2008). Phylogenetic relationships of the genus *Taxus* inferred from chloroplast intergenic spacer and nuclear coding DNA.. Biol. Pharm. Bull. Vol. 31, No. 2, 260—265. Sociedad Farmacéutica de Japón.
- Dal Bosco, D., Sinski, I., Ritschel, P.S. y Quecini, V. (2010). Residues of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Plant Tissue Culture Glassware: Their Effects and A Decontamination Protocol. International Journal of Biotechnology and Biochemistry Vol. 6 No. 4, 617–624.
- Deus-Neuman, B. y Zenk, H.M. (1984). Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. Planta Med. (50) : 427-431.
- DiCosmo , F y Towers, G.H.N. (1984). Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. Recent advances in Phytochemistry, Timmerman, B.N., F.A. Steelink y F.A. Loewus, (Eds.) Plenum Press. EUA.
- Fett-Neto A.G., Zhang W.Y. y DiCosmo F. (1994). Kinetics of taxol production, growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. Biotechnology and Bioengineer. (44) : 205-210.
- Flower, M.W. (1971). Studies on the growth in culture of plants cell: XIV. Carbohydrate oxidation during the growth of *Acer pseudoplatanus* L. cells in suspensión culture. J. Exp. Bol. (22) :715-724.
- Furmanowa, M., Glowniak, K., Syklovska-Baranek, K., Zgórká, G. y Józefczyk, A. (1997). Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus x media* var. *Hatfieldii*. Plant cell, tissue and organ culture (49) : 75-79.
- Gamborg O.L., Miller R.A. y Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Research (50) : 151-158.

- 
- George, E. y Sherrington, P. (1984). Plant propagation by tissue culture. Editorial Exegetics Limited. England.
- Gibbson, A.M., Ketchumna, R.M., Hirasuna, T.J. y Shuler, M.L. (1995). Potential of plant cell culture for taxane production. Suffness, M. Press. 71-95.
- Gros, E., Pomilio, A., Seldes, A. y Burton, G. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. EUA.
- Guerrero Rodríguez, B. (1997). Aislamiento y elucidación estructural de un peracetiltaxano y otros constituyentes del tejo mexicano *Taxus globosa* Schledl (Taxaceae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Herrera Santoyo, J. (2007). Cultivos de células en suspensión de *Hippocratea excelsa* Kunth sometidos a dos tipos de estrés y su respuesta en la producción de metabolitos secundarios. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Hirasuna, T.J., Pestchanker, L.J., Srinivasan, V. y Shuler, M.L. (1996). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (44) : 95-102.
- Holton, R.A., Somoza, C., Kim, H.B., Liang, F., Biediger, R.J., Boatman, P.D. (1994). First synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. J. Am. Chem. Soc. (116) : 1597-1598.
- Hurtado, D. y Merino, M.E. (1994). Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, Méx.
- Jennewein, S. y Croteau, R. (2001). Taxol: Biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. Mini Review. Appl Microbiol Biotechnol (57) :13-19.
- Kanamori, I., Ashihara H. y Komanine A. (1979). Changes in the activities of the pentose phosphate pathway and pyrimidine nucleotide biosíntesis during the growth of *Vinca rosea* cell in suspensión culture. Z. Pflanzanphysiol. (93) : 437-448.
- Ketchum, R.E.B., Gibson, D.M., Croteau, R.B. y Shuler, M.L. (1999). The kinetics of taxoid accumulation in cell suspensión cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. Biotechnology and bioengineering, Vol. 62, No. 1, 97-105.
- Ketchum, R.E.B y Gibson, D.M. (1996). Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (46) : 9-16.

- 
- 
- Ketchum, R.E.B., Gibson, D.M. y Gallo G. (1995). Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (42) : 185-193.
- Khosroushahi, A.Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M.R., Omid, Y. (2005). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*.
- Kingston, D. (1991). The chemistry of taxol. *Pharmacology and Therapeutics*. (52) : 1-34.
- Kuzuyama, T. (2002). Mevalonate and Nonmevalonate pathways for the Biosynthesis of Isoprene Units. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (8) : 1619-1627.
- Leff, E. (2004). Hábitat / Habitar. Saber ambiental. Sustentabilidad, racionalidad, complejidad, poder. Siglo XXI, PNUMA, Méx. 279-300.
- León Pérez Martos, M. (2007). Transformación de isoeugenol con cultivo de células vegetales de *Bouvardia ternifolia*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky y Darnell. (2003). *Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana , 4ª. edición, España.
- Luna Vega, M. 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. Proyecto W025. México.
- Luo, J., Liu, L. y Wu, C.D. (2001). Enhancement of paclitaxel production by abscisic acid in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters* (23) :1345–1348.
- Mirjalili, N. y Linden, J.C. (1996). Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models. *Biotechnol. Prog.* (12) : 110-118.
- Mittermeier, R.C.G. y Robles Gil, P. (1997). Megadiversidad. Los países biológicamente más ricos del Mundo. Cemex . Méx.

- 
- 
- Morris, P., Rudge, J ., Cresswell, K., Fowler, M.J. (1989). Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus*. V. Long-term maintenance of cells on a production medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* (17) : 75-90.
- Murashige, T. y Skoog, F.A. (1962). A revised medium for rapid growth and biosynthesis with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* (15) : 473-497.
- Navarro, S. y Vera, R. (1994). Historia del cultivo de tejidos vegetales. Cultivo de tejidos vegetales. D. Hurtado y M.E. Merino editores. Capitulo 1, 15-34.
- Nicholson, R. y Munn, D.X. (2003). Observations on the Propagation of *Taxus globosa* Schltdl. *Nota Botánica, Biol. Soc. Bot. México* (72) : 129-130.
- Nicolaou, K.C., Dai, W.M. y Guy, R.K. (1994). Chemistry and Biology of Taxol. *Angewandte Chemie* (33) : 15-44
- Oksman-Caldentey, K.M. e Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* Vol.9 No.9.
- Pardee, A.B. (1989). G1 Events and regulation of cell proliferation. *Science.* (246) : 603-608.
- Pierik. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, 3a. edición, España.
- Robert, M.L. y Loyola, V.M. (1985). El cultivo de tejidos vegetales en México. CICY y CONACyT, 1a. edición, México, D.F.
- Roberts, S.C. (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature chemical biology*, Vol. 3, No. 7, 387-395.
- Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones. CIAT, Colombia. 969 pp.
- Rowinsky, E.K., Cazenave, L. y Donehower, R.C. (1990). Taxol: A novel investigational antimicrotubule agent. *Review*, Vol. 82, No. 15, 1247-1257.
- Rudolf, P.O. (1974). *Taxus* L., yew. Schopmeyer CS, tech. coord. Seeds of woody plants in the United States. *Agric. Handbk.* 450, USDA Forest Service.
- Rushforth, K. (1987). Conifers. Facts On File Publications. England.

- 
- 
- Sarukhán, J., Soberón J. y Larson-Guerra J. (1996). Biological Conservation in a High Beta-diversity Country en La diversidad biológica de México: Estudio de País. Conabio, México.
- Schenk, R.U. y Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. (50) : 199-204.
- SEDUE, (1991). Diario oficial de la Federación. CDLII, 12, 7.
- Seigler, D.S. (1981). Secondary metabolites and plant systematics. PK. Stumpf y EE Conn.(ed.). The Biochemistry of Plants. Vol. 7. Secondary Plant products. 139-176.
- Shemluck, M.J., Estrada, E., Nicholson, R., Brobst, S.W. (2003). A preliminary study of the taxane chemistry and natural history of the Mexican yew, *Taxus globosa* Schlttdl. Botánica Económica y Etnobotánica. Biol. Soc. Bot. Méx. (72) : 119-127.
- Sierra, M.I., van der Heijden, R., van der Leer, T. y Verpoorte, R. (1992). Stability of alkaloid production in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* during long-term subculture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (28) : 59-68.
- Soto Hernández, M., Sanjurjo, M., González, M.T., Cruz, D., Giral, F. (2000). El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.) Potencial de su aprovechamiento en taxol. CIENCIA Ergo Sum, noviembre ,Vol. 7-3, 277-279. UAEM, México.
- Srinivasan, K. y Muthumary, J. (2009). Taxol production from *Pestalotiopsis* sp. an endophytic fungus isolated from *Catharanthus roseus*. Journal of Ecobiotechnology (1/1) : 28-31.
- Stierle, A., Strobel, G. y Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. Science (260) : 214-216.
- Strobel, G.A., (2001). Taxol. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons. EUA.
- Tabata, H. (2004). Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. Adv Biochem Engin/Biotechnol (7) : 1-23.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Plant Physiology. 4a. edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, EUA.

- 
- 
- Teale, W.D., Paponov, I.A. y Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development, *Nat. Rev.: Molecular Cell Biology* (7) : 847-859.
- Torres, C. (1988). *Tissue culture techniques for horticultural crops*. Published by Van Nostrand Reinhold. 27-51.
- Valencia Ortiz, C. (1995). *Fundamentos de fitoquímica*. 1a. edición, editorial Trillas. México.
- Verma, D.P.S. y Marcus A. (1974). Activation of protein synthesis up on dilution or *Aractus* cell culture from the stationary phase. *Plant Physiology* (53) : 83-84.
- Villaviscencio Juárez, L.G. (2002). Optimización y caracterización fisiológica y bioquímica de cultivos en suspensión de células de maíz (*Zea mays*, L. raza chalqueño). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Wang, Y.D., Yuan, Y.J. y Wu, J.C. (2004). Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Biochemistry Enge. Journal*. (19) : 259-65.
- Wani, M.C., Tayler, H.L., Wall, M.E., Coggon, P. y McPhail, A.T. (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.
- Waugh, J. y Wagstaff, A.J. (2004). The paclitaxel (TAXUS™)-Eluting stent. A review of this use in the management of de novo coronary artery lesions. *Adis Drug Evaluation*; 4 (4): 257-268.
- Whittaker, R.H. y Fenny, P.P. (1971). Allelochemicals : chemical interaction between species. *Science* (171) : 757-770.
- Wu, J. y Ge, X. (2004). Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, an Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. Wiley InterScience. DOI: 10.1002/bit.10911.
- Yukimune, Y., Hara, Y., Higashi, Y., Ohnishi, N., Tabata, H. y Suga C. (1995). Anticancer taxane diterpenes in high yield from *Taxus* species. Japanese Patent 95-09825.



- 
- Yukimune, Y., Hara, Y., Nomura, E., Seto, H. y Yoshida, S. (2000). The configuration of methyl jasmonate affects paclitaxel and baccatin III production in *Taxus* cell. *Phytochemistry* (54) : 13-17.
- Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. y Hara, Y. (1996). Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature biotechnology*, Vol. 14, 1129-1132.
- Zamudio Ruíz, S. (1992). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 9. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Zavala Chávez, F., Soto Hernández, M., Rodríguez González, M.T. (2001). El Romerillo (*Taxus globosa* Schlecht.): Biología, dificultades y perspectivas de uso. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 7 (1): 77-94.
- Zavala Chávez, F. (2002). Análisis demográfico preliminar de *Taxus globosa* Schlecht en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo, México, II. Población de juveniles y algunos datos de semillas. *CIENCIA Ergo Sum*, Vol. 9-2, 177-183.
- Zhang, C.H., Mei, X.G., Liu, L. y Yu, L.J. (2000). Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Lett.* (22) : 1561-1564.
- Zhong, J.J. (2002). Plant Cell Culture for production of paclitaxel and others taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering. Review*, Vol. 94, No. 6, 591-599.

**Páginas electrónicas:**

- OMS. <http://www.who.int>
- CONABIO. <http://www.conabio.gob.mx>
- Figura 3: [www.monografías.com/trabajos73/tecnicas-biotecnologia](http://www.monografías.com/trabajos73/tecnicas-biotecnologia)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agente activo del Vanish®: [es.wikipedia.org/wiki/Peróxido\\_de\\_hidrógeno](http://es.wikipedia.org/wiki/Peróxido_de_hidrógeno)
- Hipoclorito de sodio (NaClO):  
[www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/Seminarioesterilizacion](http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/Seminarioesterilizacion)
- Tween 20®: [es.wikipedia.org/wiki/Polisorbato\\_20](http://es.wikipedia.org/wiki/Polisorbato_20)
- Vance, N.C. y Rudolf, P.O. *Taxus* L. yew. Taxaceae-yew family. FAO, USDA :  
[www.nsl.fs.fed.us/wpsm/Taxus.pdf](http://www.nsl.fs.fed.us/wpsm/Taxus.pdf)