



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Obtención de líneas celulares de *Taxus globosa* S. tejo
mexicano para la producción de paclitaxel y baccatina**

III

T E S I S

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Presenta:

IBQ. Manuel Adrián Martínez Ancheyta

Directora:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Subdirección Académica

División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemerita Madre de la Patria"

H. Veracruz, Veracruz, **17/noviembre/2020**

OFICIO ITV/DEPI/No 536/2020
Asunto: Autorización de impresión

**MANUEL ADRIÁN MARTÍNEZ ANCHEYTA
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada:

**"Obtención de líneas celulares *Taxus globosa* S. tejo mexicano
para la producción de paclitaxel y bacatina III"**

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE

*Excellencia en Educación Tecnológica
Antorcha y Luz de Fuego Permanente*

**BENIGNO ORTIZ MÚNIZ
JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INVEST.**

**MADELEINE HIDALGO MORALES
PRESIDENTE**

**BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ
SECRETARIO**



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**CAROLINA PEÑA MONTES
VOCAL**

**MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA
SUPLENTE**



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897 Veracruz Ver. Tel. (229) 934 1500

www.veracruz.tecnm.mx





EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Subsección Académica

División de Estudios de Posgrado e Investigación

2020 Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria

El presente trabajo de tesis titulado "Obtención de líneas celulares *Taxus globosa* S. tejo mexicano para la producción de paclitaxel y baccatina III" presentado por el (la) C. Manuel Adrián Martínez Ancheyta, ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

DIRECTORA


MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA

REVISORA


MADELEINE HIDALGO MORALES

REVISORA


BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ

REVISORA


CAROLINA PEÑA MONTES



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897 Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500

www.veracruz.tecnm.mx



DEDICATORIA

Para ser honesto, hay tantas personas a las que quisiera agradecer y dedicar este logro. En mi vida han llegado grandes seres humanos y pocos son los que han permanecido en este camino tan crudo, lleno de desafíos que sin mentirles me han quebrantado en más de una ocasión.

Con dedicatoria especial a mis padres, pues son mi motor y aunque el tiempo y la distancia han conspirado para alejarlos de mí, los llevo en el corazón. Mi madre, que ha dado todo y daría la vida por sus hijos me ha demostrado su amor inmenso de muchas maneras.

A mi padre, quien nunca dejó de ser el pilar de nuestra familia, tu ausencia no fue excusa para perderme, al contrario; siempre he ido más allá para que cuando alcance tus pasos podamos caminar hombro a hombro, pues, aunque no tengas una profesión para mí no hay posgrados que representen tu inmensa entrega y conocimiento de la vida.

A mis hermanas, Zoila Reina Martínez Ancheyta y Jacqueline Martínez Ancheyta, que nunca dejaron de creer en mí, gracias por su amor y apoyo.

A mi mentora, la Maestra Dulce María Barradas Dermitz, quien me ha guiado a lo largo de este proyecto y puedo constatar la calidad humana que la caracteriza, gracias, siempre gracias.

A mis amigos, Carlos Valenzuela Orozco (mi gordo), Carlos Esteban Morfín Real (Morfín), Dulce María Beltrán Palacios (Dulce), Edgar Eduardo García Cruz (el chino), Jesús Javier Morales Martínez (JJ), Valentín del Ángel Pérez García (el pinchi), Daniela Guadalupe Núñez Girón (Dani). Todos han dejado huella en mí y me han dado un motivo por el cual seguir luchando, les agradezco infinitamente su amistad porque puedo decir que soy una persona difícil de complacer.

A mi amigo personal, el IBQ. Adán Francisco Gallegos Cabra, quien a pesar de tomar caminos separados siempre me ha motivado para cumplir mis metas, festeja conmigo mis logros y me acompaña en las tristezas.

Al Creador, porque ha puesto en mi camino a las personas correctas en los momentos indicados quienes me han enseñado de la vida a entender que el sufrimiento es indispensable para poder reconocer la dicha de la felicidad.

RECONOCIMIENTOS

A la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) del Tecnológico Nacional de México campus Veracruz, por la oportunidad de crecimiento profesional.

Al Dr. Martín Mata Rosas jefe del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Ecología de la ciudad de Xalapa, Ver., por su colaboración y de su equipo de trabajo, quienes hicieron posible el desarrollo de este proyecto.

A la Mta. Patricia M. Hayward-Jones por el apoyo en las revisiones del documento y artículo en el idioma inglés.

A la Dra. Ma. Guadalupe Aguilar Uscanga, por haberme brindado las herramientas necesarias para el desarrollo de la tesis y por contribuir en mi desarrollo profesional motivándome en la participación de eventos locales, regionales y nacionales.

A CONACyT, por el apoyo económico otorgado durante estos cuatro semestres de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica.

RESUMEN

Martínez Ancheyta, Manuel Adrián. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz-Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Noviembre, 2020. Caracterización cinética de líneas celulares de *Taxus globosa* S. tejo mexicano para la producción de paclitaxel y bacatina III. Asesora: Aguilar-Uscanga, María Guadalupe.

El árbol del tejo mexicano (*Taxus globosa* S.), tiene la capacidad de sintetizar alcaloides diterpénicos conocidos como taxoides, entre los que destaca el paclitaxel y su precursor bacatina III. El interés en el paclitaxel es debido a su acción antineoplásica en tratamientos de diversos tipos de cáncer. Para la obtención de este alcaloide diterpénico se han reportado métodos que no comprometen la vida de los árboles de este género, como son: por síntesis química (aproximadamente 30 pasos de reacción); por semisíntesis partiendo de los precursores naturales del paclitaxel (bacatina III y 10-diacetil-bacatina III); a partir de microorganismos asociados al árbol (hongos endofíticos); y por cultivo *in vitro* de células de especies de *Taxus*. Este último método es el que se aplica industrialmente para la producción de paclitaxel, por las especies *baccata* y *chinensis*. En México, se cuenta con la especie *Taxus globosa* S., tejo mexicano o romerillo, la cual *in vivo* se destaca por contener mayores concentraciones de paclitaxel comparado con las especies *baccata* y *chinensis*, sin embargo, *in vitro* hasta ahora no ha logrado superar a estas dos especies.

Considerando que la concentración de taxanos varía de acuerdo a la especie o variedad del tejo, el presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento y caracterización de nuevas líneas celulares de ejemplares de *Taxus globosa* S. crecidos en dos regiones del estado de Veracruz, Mex. Para ello se establecieron cultivos de callos a partir de tres explantes: hojas, tallos y meristemas, obtenidos de árboles jóvenes localizados en zonas montañosas del estado; la finalidad es ampliar el banco de líneas celulares que se tiene de esta especie en el laboratorio de Bioingeniería, así como de conocer su respuesta biosintética en cultivo *in vitro* bajo condiciones que permitan mayores rendimientos del bioactivo de interés. Se evaluó el crecimiento de callos y la producción de taxanos en cultivos en suspensión utilizando medio Gamborg B5 suplementado con sacarosa y reguladores de crecimiento.

Los resultados obtenidos del análisis de taxanos reveló diferencias en la concentración de acuerdo al origen del explante. Siendo aquellos obtenidos de la zona del Alto Pixquiac, Acajete, Ver., y explantes de hojas los que alcanzaron concentraciones de bacatina III (4.887 mg/L) y paclitaxel (13.121 mg/L) a los 6 y 27 días de cultivo, respectivamente. Además, de acuerdo al estudio de los reguladores de crecimiento, el tratamiento AP1 que contenía 2,4-D (4.42 mg/L), GA3 (0.346 mg/L) y Kin (0.86 mg/L) fueron los que presentaron mayor respuesta en cuanto al crecimiento celular y producción de metabolitos secundarios.

ABSTRACT

Martínez Ancheyta, Manuel Adrián. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz-Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. November, 2020. Kinetic characterization of cell lines of *Taxus globosa* S. Mexican yew for the production of paclitaxel and baccatin III. Supervisors: Aguilar-Uscanga, María Guadalupe.

The Mexican yew tree (*Taxus globosa* S.), has the ability to synthesize diterpenic alkaloids known as taxoids, among which paclitaxel and its precursor baccatin III stand out. The interest in paclitaxel is due to its antineoplastic action in treatments of various types of cancer. To obtain this diterpene alkaloid, methods that do not compromise the life of the trees of this genus have been reported, such as: by chemical synthesis (approximately 30 reaction steps); by semisynthesis starting from the natural precursors of paclitaxel (baccatin III and 10-diacetyl-baccatin III); from microorganisms associated with the tree (endophytic fungi); and by *in vitro* culture of cells of *Taxus* species. This last method is the one that is applied industrially for the production of paclitaxel, by the *baccata* and *chinensis* species. In Mexico, there is the species *Taxus globosa* S., Mexican yew or romerillo, which *in vivo* stands out for containing higher concentrations of paclitaxel compared to the *baccata* and *chinensis* species, however, *in vitro* so far it has not managed to exceed these two species. Considering that the concentration of taxanes varies according to the species or variety of yew, the present work aimed at the isolation and characterization of new cell lines from *Taxus globosa* S. specimens grown in two regions of the state of Veracruz, Mex. For this, callus cultures were established from three explants: leaves, stems and meristems, obtained from young trees located in mountainous areas of the state. Callus growth and taxane production were evaluated in suspension cultures using Gamborg B5 medium supplemented with sucrose and growth regulators. The results obtained from the taxane analysis revealed differences in concentration according to the origin of the explant. Those obtained from the area of Alto Pixquiac, Acajete, Ver., And leaf explants were those that reached concentrations of baccatin III (4.887 mg / L) and paclitaxel (13.121 mg / L) at 6 and 27 days of culture, respectively. In addition, according to the study of growth regulators, the AP1 treatment containing 2,4-D (4.42 mg / L), GA3 (0.346 mg / L) and Kin (0.86 mg / L) were the ones that presented the highest response regarding cell growth and paclitaxel and baccatin III production.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Cáncer: un problema de salud pública en México y el mundo	2
2.1.1 Tratamientos.....	3
2.2 Paclitaxel: origen, química, farmacología y toxicología.....	5
2.2.1 Biosíntesis de paclitaxel	8
2.2.2 Análisis comparativo de procesos de producción de paclitaxel y baccatina III	12
2.3 El género <i>Taxus</i>	14
2.3.1 <i>Taxus globosa</i> S. o tejo mexicano	16
2.4 Cultivo de células vegetales <i>in vitro</i>	22
2.4.1 Cultivo de líneas celulares en suspensión	24
2.5 Justificación	28
2.6 Objetivos	29
2.6.1 Objetivo general	29
2.6.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1 Material biológico.....	30
3.1.1 Generación de líneas celulares	30
3.1.2 Cultivo de células vegetales en suspensión	35
3.1.3 Técnica de mantenimiento de los cultivos celulares	36
3.2 Estudio cinético de las líneas celulares	36
3.3 Determinaciones analíticas	37
3.3.1 Determinación de biomasa	37
3.3.2 Conteo celular y viabilidad.....	38
3.3.3 Cuantificación de sustratos y productos	39
3.3.4 Rendimiento de producto	41
3.3.5 Velocidad específica de crecimiento y de formación de productos	41

3.3.6 Tiempo de duplicación	41
3.4 Efecto del empleo de reguladores de crecimiento en la producción de paclitaxel y bacatina III.	42
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1 Generación de nuevas líneas celulares de <i>T. globosa</i>	43
4.1.1 Generación de las líneas celulares.....	43
4.1.2 Selección y establecimiento de las líneas celulares en suspensión	46
4.2 Efecto del empleo de reguladores de crecimiento en la producción de paclitaxel y bacatina III.	54
4.3 Desarrollo y establecimiento de la mejor línea celular productora de paclitaxel y bacatina III.	62
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
5.1 CONCLUSIONES.....	68
5.2 RECOMENDACIONES.....	69
6. BIBLIOGRAFÍA.....	70

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 2.1 Acontecimientos importantes del desarrollo del paclitaxel (Taxol®).....	5
TABLA 2.2 Listado de enzimas implicadas en la biosíntesis de paclitaxel.	10
TABLA 2.3 Métodos de obtención de paclitaxel.	12
TABLA 2.4 Microorganismos productores de paclitaxel.....	13
TABLA 2.5 Distribución geográfica de <i>Taxus</i>	14
TABLA 2.6 Concentración de taxanos en especies de <i>Taxus</i> (base seca).....	20
TABLA 2.7 Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica extraídas de especies vegetales.	23
TABLA 3.1 Concentración de reguladores de crecimiento.....	32
TABLA 3.2 Composición de medios Gamborg B5 empleados (modificado ITV-Anc).	33
TABLA 4.1 Parámetros cinéticos de líneas celulares de <i>T. globosa</i> S.....	50
TABLA 4.2 Producción máxima de taxanos de acuerdo al tratamiento al que fueron sometidos....	54
TABLA 4.3 Estudios de <i>Taxus globosa</i> S. sobre la producción de antitumorales por cultivo in vitro de células vegetales.	66

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 2.1 Estructura química del paclitaxel (DrugBank, 2018).	6
FIGURA 2.2 Ruta metabólica para la biosíntesis de taxol (Jennewein et al., 2004).....	9
FIGURA 2.3 Características morfológicas del género <i>Taxus</i> . A) Rama con agujas, llamadas estribos (hojas); B) Rama femenina con semillas características de color rojo; C) Estróbilos; D) Semillas cubiertas del arilo carnoso de color rojo (López-Herrera, 2008).....	15
FIGURA 2.4 Distribución geográfica potencial del <i>Taxus globosa</i> S. en regiones montañosas de México (Contreras-Medina et al., 2010).....	16
FIGURA 2.5 <i>Taxus globosa</i> S. 1. Distribución de hojas, 2. Ramificaciones del árbol, 3. Brote de fruto con arilo rojizo.	17
FIGURA 2.6 Variables que afectan la producción de taxanos en cultivos celulares de <i>Taxus</i>	26
FIGURA 3.1 Ejemplar y explantes de <i>Taxus globosa</i> Schltdl. A. Ejemplar localizado en el Pinal-Encinal, Xalapa, Ver.; B. Hojas y tallos durante el proceso de esterilización; C. Explantes de tallos con brotes de callo en medio de inducción.	30
FIGURA 3.2 Detalles la rejilla de la cámara de Neubauer mejorada.....	38
FIGURA 4.1 Generación de callos de acuerdo a la escala propuesta por Santana (1982): grado 1, grado 2 y grado 3, respectivamente.	44
FIGURA 4.2 Contaminación por hongos en cultivos de <i>Taxus globosa</i>	45
FIGURA 4.3 Perfiles cinéticos preliminares de producción de biomasa seca de líneas celulares de <i>Taxus globosa</i> S.	47
FIGURA 4.4 Perfiles cinéticos de producción de biomasa de líneas celulares de <i>Taxus globosa</i> AP1: hoja, tallo y meristemo.	49
FIGURA 4.5 Perfiles cinéticos de producción de biomasa de líneas celulares de <i>Taxus globosa</i> AP1: hoja, tallo y meristemo.	49
FIGURA 4.6 Perfiles de sustrato residual en líneas celulares (hoja, tallo y meristemo) de <i>Taxus globosa</i> sometidas a tratamientos AP1 y AP2.	52
FIGURA 4.7 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos en la línea celular de hoja AP1.	55
FIGURA 4.8 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos de la línea celular de tallo AP1.	56
FIGURA 4.9 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos de la línea celular de meristemo AP1.	57
FIGURA 4.10 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos de la línea celular de hoja AP2.	57
FIGURA 4.11 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos de la línea celular de tallo AP2.	58
FIGURA 4.12 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos de la línea celular de meristemo AP2.	59
FIGURA 4.13 Comportamiento cinético de la producción de bacatina III y paclitaxel en líneas celulares (hoja, tallo y meristemo) de <i>Taxus globosa</i> sometidas al tratamiento AP1 y AP2	60
FIGURA 4.14 Viabilidad de los cultivos celulares de <i>Taxus globosa</i> en suspensión.	61
FIGURA 4.15 Producción de paclitaxel en líneas celulares de Hoja AP1 y AP2.....	62

FIGURA 4.16 Vista a microscopio de la línea celular de hoja AP1 de <i>Taxus globosa</i> . (1) los primeros 10 días de cultivo, (2) periodo correspondido entre 12-24 días, (3-4) células poco viables a partir de los 27 días de cultivo.	63
FIGURA 4.17 Comportamiento cinético de biomasa y sustrato residual (glucosa y sacaros) de la línea celular de hoja AP1 (<i>Taxus globosa</i>).	64
FIGURA 4.18 Producción de paclitaxel y bacatina III con respecto al tiempo en la línea celular de Hoja AP1 (<i>Taxus globosa</i>).	65

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen la capacidad de producir diversos compuestos bioactivos como parte de su metabolismo secundario, una gran variedad de estos tiene potencial en el área farmacéutica. Entre las especies de plantas con esta particularidad se encuentran las del género *Taxus*, las cuales tienen la capacidad de sintetizar alcaloides diterpénicos conocidos como taxoides, entre los que destaca el paclitaxel un antitumoral utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cánceres. Originalmente, este compuesto fue aislado de la corteza del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*) mediante un proceso de extracción que presenta rendimientos de 0.01% (p/p), debido a esto deja de ser rentable, además, de los impactos negativos al ambiente.

En México, se cuenta con la especie *Taxus globosa* S., tejo mexicano o romerillo, la cual debido a su lento crecimiento y a la baja producción de metabolitos *in vitro* ha ocasionado limitaciones en cuanto a su estudio fisiológico y a los cambios que experimentan en los procesos de adaptación. En el laboratorio de Bioingeniería de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) del Tecnológico Nacional de México campus Veracruz (ITVer) se cuenta con líneas celulares generadas sobre producción de antitumorales por cultivo *in vitro* de células vegetales con el objetivo de desarrollar un proceso biotecnológico que permita la producción de paclitaxel.

El éxito del empleo del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, está influenciado por la composición química del medio de cultivo y los factores ambientales. Los callos son generados con ayuda de reguladores de crecimiento vegetal (auxinas, citocinas, giberelinas y otros), que fomentan la elongación y formación de callos, además de favorecer la división celular y la formación de ramificaciones. Este proyecto contempla la obtención y caracterización de nuevas líneas celulares de *T. globosa* S., así como el estudio del efecto de la adición de reguladores de crecimiento sobre la producción de biomasa y la producción de paclitaxel y baccatina III; así mismo, incluye la evaluación de la estabilidad de las líneas celulares. Con esto se busca mejorar sustancialmente las condiciones de cultivo y el establecimiento de líneas celulares que permitan mayores rendimientos en los cultivos en suspensión para poder evaluar el uso de esta especie en posibles aplicaciones industriales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer: un problema de salud pública en México y el mundo

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define al cáncer como un “término genérico que designa un amplio grupo de tumores malignos o neoplasias malignas”. Cada tipo de cáncer tiene su origen como una alteración en una de las células la cual tiende a multiplicarse dando lugar a una población de células hijas que se reproducen de un modo desenfrenado (OMS, 2018). La Sociedad Americana del Cáncer (ACS, por sus siglas en inglés) comentan que “Una característica del cáncer es el proceso de metástasis, el cual se refiere a la proliferación anormal de células que se extienden más allá de sus límites normales y éstas pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos” (ACS, 2016).

El cáncer es considerado como la segunda causa de muerte a nivel mundial. La incidencia y mortalidad se han ido incrementando en las últimas dos décadas; en el año 2000 se estimó 10.1 millones de casos nuevos, de los cuales aproximadamente el 61% representan las defunciones causadas por la enfermedad. Así mismo, en año 2007 las incidencias alcanzaron la cifra de 11.3 millones, el 61% de éstos corresponden a las muertes. El Informe Mundial sobre el Cáncer publicado por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, 2014., por sus siglas en inglés); señaló que en el 2012 hubo aproximadamente 14 millones de casos nuevos de los cuales 8.2 millones corresponden a defunciones; estas cifras se ven incrementadas, puesto que en el año 2015 las muertes alcanzaron 8.8 millones de casos. Una estimación más reciente de la OMS, fue la emitida por la IARC en septiembre de 2018, el cual calcula que la carga mundial del cáncer ha aumentado 18.1 millones de casos nuevos de los cuales el 53% representa las defunciones, además, se prevé que las cifras aumenten en las próximas décadas (OMS, 2014 y 2018; INEGI, 2017; IARC, 2018).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) 2014., señala que, en la región de las Américas, el cáncer representa la segunda causa de muerte. En el 2012 se registraron 2.8 millones de nuevos casos y 1.3 millones de muertes; siendo los tipos más frecuentes: los cánceres de pulmón, próstata y colorrectal en hombres; y los cánceres de mama, pulmón y colorrectal entre las mujeres. Aproximadamente un 47% de las muertes por cáncer se produjeron en América Latina y el Caribe. Se estima un incremento del 67% de nuevos casos

2. ANTECEDENTES

de cáncer entre los años 2012-2030, y para este último se prevé un aumento de 2.1 millones de muertes. El cáncer de pulmón fue responsable de aproximadamente 260 mil muertes en el 2012, considerado así el tipo de cáncer que produce mayor número de defunciones en la región.

Cerca del 47% de los casos y del 55% de las muertes por cáncer se producen en las regiones menos desarrolladas del planeta. En México, el cáncer ha sido considerado como un problema de salud pública desde 1990; en el 2009, murieron 65 de cada 100 mil personas a consecuencia de tumores malignos; tres años más tarde, en el 2012 se contaba con una población de aproximadamente 117 millones habitantes de los cuales el 49% representan a hombres y el 51% a mujeres, en este año se registraron alrededor de 148 mil casos nuevos de cáncer en la población, de los cuales cerca del 53% representaron las defunciones causadas por esta enfermedad (IARC, 2014).

Durante el 2010 del total de egresos hospitalarios por tumores, el 56% son debidos a tumores malignos; los cuales en jóvenes representa 71 de cada 100 y para la población adulta, 53. Las incidencias y la tasa de mortalidad engloban más de cien diferentes tipos de cánceres que en la mayoría de los casos se trata de padecimientos crónico-degenerativos; entre los tipos de cánceres más frecuentes en hombres se destaca el de próstata, así como en mujeres el cáncer de mama (IARC, 2014; INEGI, 2018).

2.1.1 Tratamientos.

Uno de los mayores problemas del cáncer es su detección ya que ésta es la clave para su tratamiento. A menudo se detecta en sus fases posteriores cuando ya se ha afectado la función de uno o más sistemas vitales del organismo. Para poder diagnosticar cáncer se realizan una serie de valoraciones en donde los síntomas constituyen signos de evidencias de este padecimiento (Martínez y García, 2012).

El cáncer toma su nombre según el órgano en el que se genere, de aquí que puedan denominarse: carcinoma, sarcoma y linfoma. Una revisión física rutinaria ayuda en ciertos tipos de cáncer, esta práctica puede proporcionar mayores oportunidades de tener otras

2. ANTECEDENTES

opciones de tratamiento. Hay diversos tratamientos utilizados para el cáncer con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes, incluso para aquellos que ya no tienen cura; algunas personas recibirán combinaciones de tratamientos los cuales dependen del tipo de cáncer y de lo avanzado se encuentre (Coleman, 2008; National Cancer Institute NCI, 2017).

Los principales tratamientos utilizados para este padecimiento son la cirugía, la quimioterapia y la terapia de radiación; los cuales buscan reducir o eliminar la masa tumoral. Generalmente, se recurre a la cirugía como primera instancia para extirpar el cáncer del cuerpo, de la misma forma la terapia de radiación se emplea para destruir células cancerosas y reducir tumores. Después, se recurre a la quimioterapia para tratar cualquier célula que pudiera haber producido una metástasis, esta terapia incluye la combinación de fármacos o sustancias citotóxicas. Cabe señalar que pueden realizarse combinaciones de terapias (en caso de ser necesarias) para obtener mejores resultados (Coleman, 2008; National Cancer Institute NCI, 2017).

Cuando las posibilidades de curar al paciente se agotan, en estos casos la meta del tratamiento es reducir los síntomas que se presenten, mejorar su calidad de vida y prolongarla lo más posible, este tipo de tratamiento se le denomina cuidado paliativo. Además, los avances científicos y tecnológicos han permitido el desarrollo de nuevos tratamientos en la que los fármacos o sustancias citotóxicas interfieren de manera específica sobre un objetivo en particular, causando así la muerte de la célula neoplásica; estos tratamientos son conocidos como terapia blanco, terapia dirigida o terapia inteligente (National Cancer Institute NCI, 2017).

De acuerdo a lo anterior, entre los fármacos utilizados en quimioterapias destacan los de origen vegetal, debido a su mecanismo de acción lo cual generalmente los hace más eficientes para erradicar células cancerosas. Uno de estos compuestos es el paclitaxel el cual ha sido utilizado para el tratamiento de cáncer ovárico, cancer de mama, cancer de pulmón y carcinoma gástrico; este compuesto ha demostrado un mecanismo de acción único puesto que está basado en la desestabilización de los microtúbulos del citoesqueleto, lo que tiene como consecuencia la inhibición de la mitosis y la consecuente muerte celular.

2. ANTECEDENTES

2.2 Paclitaxel: origen, química, farmacología y toxicología

Los taxoides son alcaloides diterpénicos polioxigenados provenientes de la ruta metabólica del 2-metil-eritritol-4-fosfato cuya biosíntesis tiene lugar en los plastidios. El paclitaxel (Taxol®) fue aislado del árbol *Taxus brevifolia* en 1969, por Monroe E. Wall y Mansukh C. Wani (1969) como parte de un programa exploratorio del Instituto Nacional del Cáncer y desencadenó una serie de eventos hasta su empleo en diversos tipos de cáncer (Tabla 2.1). Este producto al 2018, cuenta con aproximadamente 2,300 patentes que van desde el proceso de obtención de la materia prima hasta los métodos de tratamientos con paclitaxel (Wall y Wani, 1996; Laza *et al.*, 2003).

TABLA 2.1 Acontecimientos importantes del desarrollo del paclitaxel (Taxol®).

Evento	Año
Aislamiento de la taxanina (mezcla de alcaloides) de <i>Taxus baccata</i> .	1856
El paclitaxel es obtenido en su forma pura.	1969
Descubrimiento del mecanismo de acción.	1979
Semisíntesis del taxol.	1988
Bristol-Myers Squibb recibe la transferencia de tecnología.	1991
Síntesis total del Taxol (paclitaxel) por Holton y Nicolaou.	1994
En México, se generaron tres líneas celulares de <i>Taxus globosa</i> .	2006
Se logró detectar Paclitaxel y Bacatina III en una de las líneas celulares de <i>T. globosa</i> .	2012
La prioridad es resolver el problema de la generación de biomasa y disponibilidad de producto.	

Fuente: Propia a partir de Wall & Wani, 1996; Barrales & Ramírez, 2013.

2. ANTECEDENTES

El paclitaxel (Fig. 2.1) es un compuesto de naturaleza isoprenoide de fórmula química $C_{47}H_{51}NO_{14}$ posee un peso molecular de 853.90 g/mol y es insoluble en agua. Su estructura química está constituida por un esqueleto hidrocarbonado formado por tres ciclos de 6, 8 y 6 carbonos, respectivamente, polisustituidos con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas (entre ellas, una β -fenilisoserina que esterifica la posición C-13). La molécula del paclitaxel posee un total de 11 estereocentros. Los taxoides constituyen un grupo de compuestos diterpénicos caracterizados por la presencia de un esqueleto de taxano, el paclitaxel es uno de los principales compuestos utilizado como un potente agente quimioterapéutico (Barrales & Soto, 2011).

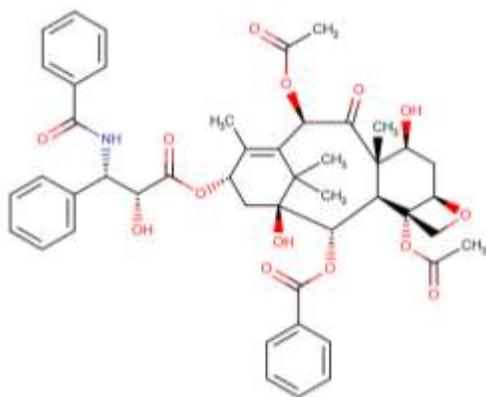


FIGURA 2.1 Estructura química del paclitaxel (DrugBank, 2018).

Debido a su actividad biológica, el paclitaxel se clasifica dentro del grupo de los denominados fármacos antimitóticos. Se utiliza para el tratamiento de diversos tipos de cánceres entre los que destacan el sarcoma de Kaposi, el cáncer de pulmón de células no pequeñas localmente avanzando o metastásico, el cáncer de ovario y el cáncer de mama metastásico. Considerado como un agente antineoplásico indicado como tratamiento de primera línea o tercera línea en tumores de células germinales, este agente antimicrotúbulo promueve el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina (bloques de construcción) y estabiliza los microtúbulos al prevenir la despolimerización induciendo posteriormente la muerte celular programada de las células cancerosas (Centro de

2. ANTECEDENTES

Investigación y Desarrollo de Medicamentos, 2012; Barrales-Cureño *et al.*, 2016; DrugBank, 2018).

Para entender el efecto del paclitaxel es importante conocer cómo se forma y se degrada el huso mitótico, puesto que esta estructura es de importancia durante la proliferación celular; este taxano evita la formación del huso provocando la generación de un polímero demasiado largo. El paclitaxel interfiere con la función normal del crecimiento de los microtúbulos, hiperestabiliza su estructura lo que impide la capacidad de la célula de utilizar el citoesqueleto de manera flexible. Específicamente, este compuesto se une a la fracción β de tubulina en un sitio que queda expuesto en el lumen de los microtúbulos; esta unión los estabiliza e impide su despolimerización. Este hecho interfiere en la división celular y provoca así la muerte de la célula (Mendoza, 2008; Lorenzo *et al.*, 2009).

A pesar de su efectividad antitumoral y debido a su farmacocinética no lineal, el paclitaxel puede presentar mayor toxicidad durante su utilización en tratamientos contra el cáncer. Entre los efectos por sobredosis incluyen la supresión de la médula ósea, neurotoxicidad periférica de predominio sensitivo y mucositis. La toxicidad hematológica es limitante de la dosis utilizada; se tienen registros de que cerca del 50% de los casos aparecen alopecia moderada-intensa, de igual manera, se pueden presentar reacciones de hipersensibilidad aguda secundarias causadas por el anillo taxano. Otros posibles efectos tóxicos son alteraciones dérmicas y ungueales, así como arritmias cardíacas y el aumento de la retención de líquidos corporales, estos efectos se encuentran relacionados directamente con la dosis suministrada (Lorenzo *et al.*, 2009; DrugBank, 2018).

El paclitaxel se administra por vía intravenosa, para el tratamiento del cáncer de ovario, de mama, de pulmón microcítico y no microcítico, tumores de cabeza y cuello, el cáncer de próstata resistente a la terapia hormonal, el cáncer gástrico, entre otros tumores malignos. Su metabolismo es hepático, con excreción biliar; en pacientes tratados con dosis de 135 y 175 mg/m² dadas en infusiones de 3 a 24 horas el promedio de la vida media terminal ha variado de 3.0 a 52.7 horas y la eliminación total del cuerpo ha variado de 11.6 a 24.0 l/h/m² lo cual indica una distribución extravascular extensa y/o unión a los tejidos. Después de 3 horas de infusión de 175 mg/m² el promedio de la vida media terminal se calculó en 9.9 horas. La

2. ANTECEDENTES

media de la eliminación total del cuerpo fue de 12.4 l/h/m². (Secretaría de Salud, 2005; DrugBank, 2018).

En México se prescribe el paclitaxel en quimioterapias contra el cáncer de mama, ovario, pulmón, vejiga, entre otros. Tan sólo en el año 2012 en demanda nacional se requirió de aproximadamente 52 Kg de paclitaxel. Debido que no existe una empresa productora de paclitaxel en México, su costo fluctúa según la cotización de la moneda extranjera (Zavala, 2015).

2.2.1 Biosíntesis de paclitaxel

El paclitaxel fue identificado a principios de 1970 a partir de un extracto crudo de *Taxus brevifolia* (tejo del pacífico). Aunque la biosíntesis del paclitaxel no se conoce completamente, se sabe que derivan de un precursor estructural común de cinco átomos de carbono conocido como isopentenil difosfato (IPP) y también del difosfato geranylgeranyl (GGPP), se considera que la ruta hacia el paclitaxel implica alrededor de 19 pasos enzimáticos del metabolismo primario de la planta (Tabla 2.2). La descripción general de la ruta biosintética del paclitaxel parte de la vía MEP la cual corresponde a la vía plastidial de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato (vía metileritritol fosfato) para el suministro de precursor C5 (IPP y DMAPP) (Jennewein *et al.*, 2004; Croteau *et al.*, 2006).

La biosíntesis de Taxol (Fig. 2.2) se puede dividir conceptualmente en varios procesos discretos, siendo el primero la construcción del esqueleto de taxano que es seguido por la adición de ocho grupos funcionales de oxígeno al núcleo. El primer paso implica la ciclación de GGPP a taxadieno por la taxadieno sintasa plastidial. Esta estructura del núcleo de taxano es luego funcionalizada por ocho oxigenasas del citocromo P450 y con dos grupos acetato y un grupo benzoato por transferasas dependientes de acil y aroil CoA (Jennewein *et al.*, 2004; Ramírez-Estrada 2015).

El segundo precursor se forma a partir de la fusión de tres moléculas de IPP más su isómero el dimetilalil difosfato (DMAPP) mediante la acción de la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa. El GGPP sirve como sustrato de la enzima taxadieno sintasa para formar taxa-4(5),

2. ANTECEDENTES

11(12)-dieno, la primera molécula de la síntesis de taxol. El segundo paso específico en la biosíntesis del taxol es la hidroxilación, dependiente del citocromo p450 (cytP450), en la posición C5 del anillo del taxano, reacción catalizada por la enzima taxadieno 5 α -hidroxilasa (H5 α), que continúa con una reestructuración alílica del doble enlace 4(5) a la posición 4(20), para dar el taxa 4(5), 11(12)-dieno-5 α -ol (Eisenreich *et al.*, 1996; Croteau *et al.*, 2006; Benítez, 2009).

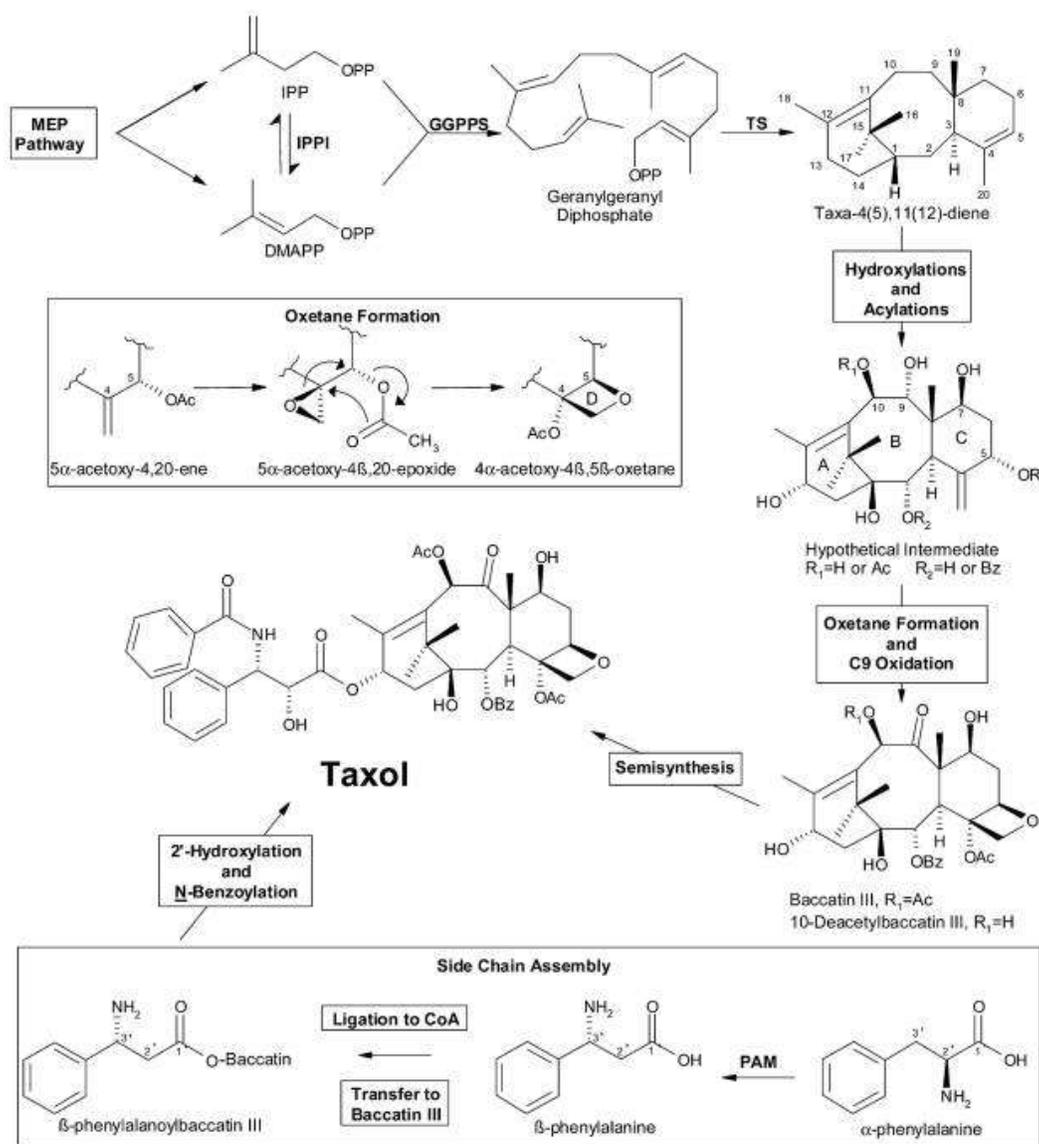


FIGURA 2.2 Ruta metabólica para la biosíntesis de taxol (Jennwein *et al.*, 2004).

2. ANTECEDENTES

TABLA 2.2 Listado de enzimas implicadas en la biosíntesis de paclitaxel.

Enzima	Abreviatura	Referencia
Geranilgeranil difosfato sintasa	GGPPS	(Hefner <i>et al.</i> , 1998)
Taxadieno sintasa	TS	(Koepp <i>et al.</i> , 1995)
Taxadieno-5 α -hidroxilasa	T5 α OH	(Hefner <i>et al.</i> , 1996)
Taxadieno-13 α -hidroxilasa	T13 α OH	(Jennewein <i>et al.</i> , 2001)
Taxadieno-5 α -ol-O-acetil-transferasa	TAT	(Walker <i>et al.</i> , 2000)
Taxano-10 β -hidroxilasa	T10 β OH	(Schoendorf <i>et al.</i> , 2001)
Taxano-14 β -hidroxilasa	T14 β OH	(Jennewein <i>et al.</i> , 2001)
Taxano-2 α -hidroxilasa	T2 α OH	(Chau and Croteau, 2004)
Taxano-7 α -hidroxilasa	T7 β OH	(Chau <i>et al.</i> , 2004)
Taxano-1 β -hidroxilasa	T1 β OH	No se ha caracterizado
C4 β , C20-epoxidasa	Nr	No se ha caracterizado
Oxomutasa	Nr	No se ha caracterizado
Taxano-2 α -O.benzoil transferasa	TBT	(Walker y Croteau, 2000b)
Taxano-10 β -O-acetil transferasa / 10-deacetilbacatina III-10-O-acetiltransferasa	DBAT	(Walker y Croteau, 2000a)
Taxano-9 α -hidroxilasa	T9 α OH	No se ha caracterizado
Fenilalanina aminomutasa	PAM	(Walker <i>et al.</i> , 2004)
β -fenilalanina-CoA ligasa	Nr	No se ha caracterizado
Bacatina III: 3-amino, 13-fenilpropanoiltransferasa	BAPT	(Walker <i>et al.</i> , 2002a)
Taxano-2' α -hidroxilasa	Nr	No se ha caracterizado
N-benzoyl transferasa	DBTNBT	(Walker <i>et al.</i> , 2002b)

Fuente: Benítez, 2009. Nr= no reportado.

La Tabla 2.2 presenta un listado de enzimas que han sido propuestas las cuales se cree que participan en la biosíntesis de paclitaxel y otros taxanos, sin embargo, aún no ha sido definida completamente.

2. ANTECEDENTES

En este punto de la biosíntesis, hay una bifurcación y el sustrato puede ser modificado por una transferasa o una hidroxilasa. Taxadieno-5 α -ol-O-acetil transferasa (TAT) acila al taxadien-5 α -ol en la posición C5 para formar taxadien-5 α -il-acetato. Por otro lado, la taxadieno-13 α -hidroxilasa (T13 α OH), hidroxila el taxadien-5 α -ol en el C13 y, menos eficientemente, el taxadien-5 α -il-acetato. El taxadien-5 α -il-acetato puede ser fácilmente hidroxilado en el C10 por una monooxigenasa CytP450, la taxano-10 β -hidroxilasa (T10 β OH), pero debido a su naturaleza menos específica T10 β OH también puede modificar otros taxanos. La taxano-14 β -hidroxilasa (T14 β OH) es responsable de la formación de taxadien-5 α -acetoxi-10 β -14 β -diol a partir de taxadien-5 α -acetoxi-10 β -diol. T14 β OH no está involucrada en la producción de paclitaxel, ya que este compuesto no presenta hidroxilación en la posición C14, pero es responsable de una ramificación de la vía metabólica de taxanos (Walker & Croteau, 2000a; 2000b; Benítez, 2009).

Un paso clave en la biosíntesis del paclitaxel es la esterificación del grupo hidroxilo de C13 de la bacatina III con la cadena lateral β -fenilalanina CoA. Esta cadena se obtiene a partir del aminoácido α -fenilalanina por la acción de la fenilalanina aminomutasa (PAM). La enzima que cataliza la conjugación de la cadena lateral de β -fenilalanina-CoA a la bacatina III es la C13-fenilpropanoil-CoA transferasa (BAPT), produciendo el compuesto 3'-N-debenzoil-2'-deoxipaclitaxel (Walker *et al.*, 2002; Benítez, 2009; Ramírez-Estrada, 2015).

Aunque BAPT puede unir β -fenilalanina y β -fenilisoserina, se cree que una 2' α -hidroxilasa no caracterizada hasta el momento podría actuar en este paso. La hidroxilasa propuesta debería pertenecer al grupo de los CytP450 y compartir otras características comunes con el resto de hidrolasas de taxanos. Estudios previos de Long y Croteau (2005) y Long *et al.*, (2008) indican que una N-benzoil transferasa (DBTNBT) sería responsable de la última etapa en la formación del paclitaxel (Ramírez-Estrada, 2015).

El conocimiento de la vía biosintética, las enzimas responsables y los agentes subyacentes pueden proporcionar la base para una mejor producción del fármaco, en árboles de tejo o, más probablemente, en cultivos celulares derivados de ellos. Este último se ha vuelto un sistema modelo para los estudios de biosíntesis del paclitaxel, debido a la facilidad de manipulación y porque la producción de este taxano es inducible con jasmonato de metilo (Jennewein *et al.*, 2004).

2. ANTECEDENTES

2.2.2 Análisis comparativo de procesos de producción de paclitaxel y baccatina III

Los primeros trabajos en donde se involucra el árbol del tejo (género *Taxus*), fueron descritos por Wall y Wani (1969), como parte de un programa exploratorio del Instituto Nacional del Cáncer. A partir de este descubrimiento, el paclitaxel (taxano utilizado para el tratamiento del cáncer) presente en estos árboles empezó a ser utilizado como droga anticancerígena, sin embargo, debido al lento crecimiento de estas especies surgieron problemas de abastecimiento.

El paclitaxel fue aislado originalmente de la corteza interna del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*), en este proceso de extracción (Tabla 2.3) se requiere de aproximadamente 1000 árboles para obtener 1 kg del compuesto con rendimientos de 0.01% p/p; no resultó viable tanto por aspectos ambientales como por aspectos económicos, promoviendo la búsqueda de métodos alternos para la obtención de este compuesto (Kieran *et al.*, 1997).

TABLA 2.3 Métodos de obtención de paclitaxel.

Referencia	Método	Materia prima y precursores
Witherup <i>et al.</i> , 1990	Extracción química	<i>T. brevifolia</i> , <i>T. canadensis</i> , <i>T. baccata</i> , <i>T. cuspidata</i> , <i>T. media</i> var. <i>Densiformis</i> , <i>T. media</i> var. <i>Hicksii</i> .
Nicolaou <i>et al.</i> , 1994 Van Rozendaal,	Síntesis química	Anillo taxano
Lelyveld, & Van Beek, 2000	Extracción química	Agujas de especies Taxaceae
Engels, Dahm, & Jennewein, 2008	Biosíntesis: ingeniería metabólica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Osuna <i>et al.</i> , 2015	Cultivo de tejidos	<i>Taxus globosa</i>

Fuente: Propia.

2. ANTECEDENTES

Entre los métodos de obtención de paclitaxel sin comprometer la vida del árbol del tejo se encuentra la síntesis química, proceso de producción a partir de extractos de especies de *Taxus*, esta metodología comprende de aproximadamente 30 pasos de reacción siendo costosa y presentando bajos rendimientos; se tiene también, el proceso de semisíntesis partiendo de los precursores naturales del paclitaxel (bacatina III y 10-diacetil-bacatina III).

Otra fuente de producción es a partir de microorganismos asociados al árbol de *Taxus* spp., generalmente, hongos endófitos; los cuales se han reportado que estando asociados a los árboles *Taxus* son capaces de producir taxanos (Tabla 2.4). Sin embargo, las concentraciones de paclitaxel producidas son por los menos dos órdenes de magnitud inferiores a los obtenidos por el cultivo de células vegetales.

TABLA 2.4 Microorganismos productores de paclitaxel.

Fuente	Microorganismo	Paclitaxel (ng/mL)
Hongos		
<i>T. baccata</i>	<i>Fusarium lateritium</i>	0.13
<i>T. chinensis</i>	<i>Fusarium solani</i>	67.9-163
<i>T. cuspidata</i>	<i>Nodulisporium sylviforme</i>	468.6
<i>T. cuspidata</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	418
<i>T. media</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	800
Bacterias		
<i>T. baccata</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	1-25
<i>T. brevifolia</i>	<i>Curtobacterium</i> sp.	1-25
<i>T. canadensis</i>	<i>Bacillus cereus</i> sp.	0.2-10
<i>T. cuspidata</i>	<i>Pantoea</i> sp.	1-25
<i>T. hunnewelliana</i>	<i>Pantoea</i> sp.	1-25

Fuente: adaptación a partir de Flores-Bustamante, 2010.

2. ANTECEDENTES

Así mismo, la producción de paclitaxel a partir de cultivos *in vitro* de callos y células en suspensión, resultando ser una de las alternativas que tiene como finalidad terminar con la dependencia directa del árbol (Nicolaou *et al.*, 1994; Kieran *et al.*, 1997; Barrales-Cureño *et al.*, 2016).

2.3 El género *Taxus*

El tejo (*Taxus* spp.) es un gimnosperma dicotiledónea, perteneciente al orden de los Taxales y a la familia Taxaceae. Este género agrupa entre siete y doce especies de plantas leñosas distribuidas alrededor del mundo (Tabla 2.5) siendo esta la principal característica distintiva de su clasificación.

En estos árboles, el tronco es grueso de aproximadamente 4 m y de corteza color pardo-grisáceo, rojizo en el interior, que con la edad se desprende en láminas alargadas. Estos ejemplares presentan una altura promedio de 10 m con diámetro de copa de 15 m. La copa puede ser muy ancha y cónica, con ramas números, largas y flexibles (López-Herrera, 2008; Barrales-Cureño & Soto-Hernández, 2012; Área de Información y Documentación Ambiental, 2015).

TABLA 2.5 Distribución geográfica de *Taxus*.

Especie	Distribución geográfica
<i>Taxus baccata</i>	Centro Europa, Norte y Oeste de Asia.
<i>Taxus brevifolia</i>	Oeste de los Estados Unidos de América
<i>Taxus canadensis</i>	Oeste de Canadá
<i>Taxus chinensis</i>	Este de China
<i>Taxus floridana</i>	Este de los Estados Unidos de América
<i>Taxus globosa</i>	Norte de México y Honduras
<i>Taxus cuspidata</i>	Japón, Corea y Manchuria
<i>Taxus wallichiana</i>	Himalaya

Fuente: Propia a partir de Zavala-Chávez *et al.*, 2001.

2. ANTECEDENTES

La nomenclatura del género *Taxus* se basa principalmente en el área geográfica por el cual se encuentran distribuidas, sin embargo, han surgido inconvenientes con la ubicación taxonómica, puesto que en el Índice Internacional de Nombres de Plantas (IPNI, 2015) se han reconocido alrededor de 55 especies en este género. Cabe señalar que, el uso de características fitoquímicas podría ayudar en el esclarecimiento taxonómico de estas especies (Zavala-Chávez *et al.*, 2001).

“Este árbol, tiene estróbilos masculinos axilares en la parte inferior de sus ramas, solitarios y rara vez en forma de espigas compactas de 2-4, con pedúnculo corto, 4-5 brácteas membranosas en la base del estróbilo, imbricadas, amarillentas. No tiene estróbilos femeninos; sólo óvulos solitarios, sensibles, ubicados en las axilas de las hojas, dispuestos en la parte posterior de las ramas, rodeados por varias brácteas membranosas verdes, con el margen escarioso” (Fig. 2.3) (López-Herrera, 2008).



FIGURA 2.3 Características morfológicas del género *Taxus*. A) Rama con agujas, llamadas estribos (hojas); B) Rama femenina con semillas características de color rojo; C) Estróbilos; D) Semillas cubiertas del arilo carnoso de color rojo (López-Herrera, 2008).

2. ANTECEDENTES

“Su floración se da entre finales las estaciones de invierno y principios de la primavera, generalmente de marzo a abril. Las semillas del ala son ovoides u oval-ovoides de 5 a 7 mm de largo por 4 mm de ancho, color café y con el ápice apiculado, generalmente cubiertas por un tejido carnososo de color rojo, llamado arilo que, a excepción del tallo, hoja y corteza, no es tóxica” (López-Herrera, 2008).

2.3.1 *Taxus globosa* S. o tejo mexicano

Taxus globosa Schltldl., comúnmente llamado tejo mexicano, romerillo o granadillo, es la única especie del género *Taxus* que se encuentra en México, considerada como una especie rara para su protección por lo restringido de su distribución natural. Se le puede encontrar desde la parte central de Nuevo León, pasando por la cuenca del Golfo de México y el Eje Neovolcánico Transversal, y esporádicamente tan al sur como Guatemala, Honduras y El Salvador (Fig. 2.4) (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT, 2002; Shemluck *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2004; Ramírez-Sánchez *et al.*, 2011).

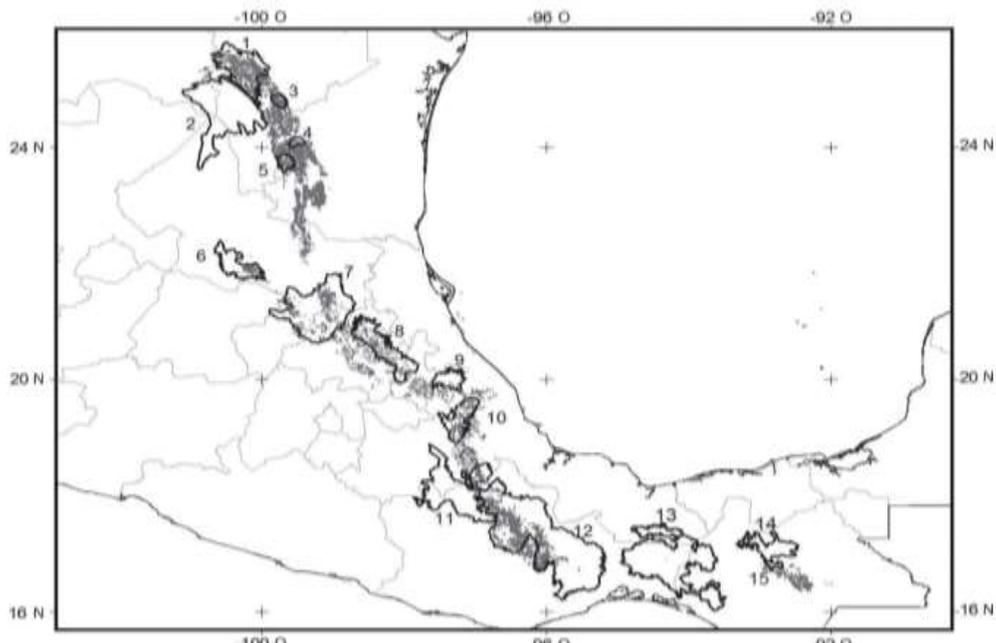


FIGURA 2.4 Distribución geográfica potencial del *Taxus globosa* S. en regiones montañosas de México (Contreras-Medina *et al.*, 2010).

2. ANTECEDENTES

T. globosa S., es un árbol perennifolio, con altura de 6 a 18 m y entre 30 y 50 cm de diámetro, debido a esto es catalogado como el más pequeño en su género; presenta corteza escamosa, es muy ramificado, con ramas colgantes y formando una copa redondeada o extendida. Las hojas se distribuyen en espiral y cuando maduran se disponen aplanadas, lineares a linear-lanceoladas, ligeramente delgadas de 2 a 3.5 cm de largo por 2 a 2.5 mm de ancho, con el extremo terminal agudo y la base angostada en un peciolo corto. Sus semillas maduras son ovoides, con testa dura de 6 a 7 mm de ancho, cubiertas parcialmente por una estructura carnosa de color rojo en forma de baya, embrión con dos cotiledones (Fig. 2.5). La especie se reproduce generalmente a través de la semilla, sin embargo, se han encontrado casos en los que su regeneración ocurre a través de rebrotes a partir de la base del tallo (López-Herrera, 2008; Contreras-Medina *et al.*, 2010; Sánchez, 2012).



FIGURA 2.5 *Taxus globosa* S. 1. Distribución de hojas, 2. Ramificaciones del árbol, 3. Brote de fruto con arilo rojizo.

2. ANTECEDENTES

En México, *T. globosa* S. tiene varios usos reportados que van desde ornamental hasta su aprovechamiento para la producción de carbón. Aunque su principal aprovechamiento tendría que ser la extracción de taxol (paclitaxel), el cual es un fármaco utilizado para el tratamiento de cáncer ovárico (Shemluck *et al.*, 2003).

En México, hasta ahora, los estudios científicos y de ingeniería sobre cultivos de células de *T. globosa* son limitados. Por otra parte, cabe señalar que esta planta en México fue incluida en el listado de especies raras, amenazadas, en peligro de extinción motivo por el cual se encuentra protegida, está incluida en la Norma Ecológica 059 (NOM-ECOL-059-1994) (SEMARNAT, 2002).

El cultivo de tejidos vegetales de *Taxus*, representa una alternativa sostenible ante los métodos tradicionales o rutas de síntesis química. Este tipo de cultivo se refiere a una serie de técnicas por las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, tejido u órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y bajo condiciones controladas con el objetivo de hacer crecer células capaces de sintetizar Paclitaxel (Calva & Pérez, 2005).

Dentro de los estudios sobre la producción de paclitaxel en diferentes especies del género *Taxus* se encuentra el de Wickremesinhe y Arteca, (1994) quienes estudiaron el efecto de las diferentes concentraciones y combinaciones de azúcares: sacarosa, glucosa y fructosa, sobre la producción de paclitaxel en *Taxus media*; con volúmenes de trabajo de 100 mL en condiciones de obscuridad a 25°C y 145 rpm de agitación, concluyeron que la concentración de inóculo óptima oscila entre 80 y 100 g/L y que toda la glucosa empleada en los experimentos fue consumida durante la segunda semana de cultivo.

Fett-Neto *et al.*, (1994) realizaron estudios con la especie *Taxus cuspidata* con volúmenes de trabajo de 50 mL en condiciones de obscuridad a 22°C y 110 rpm, alcanzando concentraciones de paclitaxel de 0.006 mg/g (BH) a los 38 días de cultivo, tendiendo como concentración de inóculo de 160 g/L (BH) concluyeron que la acumulación de paclitaxel en las células no estaba vinculada al crecimiento, por el contrario, ésta disminuía a medida que aumentaba la biomasa celular.

2. ANTECEDENTES

Uno de los aspectos que se considera crucial en el establecimiento de cultivos celulares de especies vegetales es el tipo de reactor que se emplea y las condiciones de cultivo. Srinivasan *et al.*, (1995) evaluaron tres configuraciones de reactores: matraces Erlenmeyer (250 mL) a 120 rpm, biorreactor mezclado neumáticamente (PMB) y biorreactor de tanque agitado (STB) a 100 rpm y 280 mL/min de aireación al sistema, sus experimentos fueron realizados con líneas celulares de la especie *Taxus baccata* a 25° en condiciones de obscuridad. Se concluyó que los rendimientos de producción de taxol varía de acuerdo al tipo de sistema empleado, donde las concentraciones máximas de paclitaxel para cada sistema fue 0.1 mg/L en el STB, 1.5 mg/L en el PMB y 0.3 en matraces Erlenmeyer. Se cree que el mejor rendimiento de reactor de agitación neumática (PMB) podría ser el resultado de la transferencia adecuada de oxígeno en el medio y a la baja cizalla mecánica.

Por otro lado, la concentración del inóculo puede afectar los rendimientos de los sistemas establecidos para la producción de paclitaxel. Wang *et al.*, (1997) evaluaron diferentes tamaños de inóculos de *Taxus chinensis* en sus sistemas los cuales se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de trabajo de 50 mL, sometidos a 100 rpm de agitación a 25°C. Se observó que el aumento en el tamaño de inóculo acortó considerablemente el periodo de cultivo; sin embargo, la acumulación de paclitaxel fue relativamente mayor con tamaños de inóculos bajos de 1.5 y 2 g/L en peso seco. Se requieren estudios sobre el efecto de tamaño de inóculo en la excreción de metabolitos celulares.

La adición de elicitores en los sistemas de cultivos de células vegetales promueven la excreción de paclitaxel en las líneas celulares que han sido estudiadas, Cusidó *et al.*, (2002) estudiaron el efecto de elicitores en líneas celulares de *Taxus media* en matraces Erlenmeyer de 175 mL y reactores de 5 L manteniendo una agitación de 100 rpm y en el caso de los reactores una aireación de 0.8 L/min a 25°C. Empleando como elicitor jasmonato de metilo 220 µg/g BH, mevalonato 0.38 mM, 0.2 mM N-benzoilalanina, 5µg/g BH ácido araquiónico como uno de los tratamientos, y combinaciones de mevalonato y N-benzil, reportaron que existía una mayor acumulación de paclitaxel (0.84 mg/g BH a los 20 días de cultivo) en los sistemas que fueron elicitados con jasmonato de metilo, mevalonato y N-benzoilalanina.

2. ANTECEDENTES

Zhang *et al.*, (2002) realizaron estudios con líneas celulares de *Taxus yunnanensis*; el proceso consistió en dos etapas, una de crecimiento celular y una segunda etapa de producción de metabolitos alcanzando concentraciones de 1.4 mg/L. Probaron diferentes edades de inóculo (12-24 d) con diferentes tamaños de inóculo (50-250 m/L BH), elicitados al séptimo día con plata, quitosano y jasmonato de metilo. Los resultados revelaron que la productividad de biomasa se incrementó con el tamaño de inóculo, pero disminuyó con la edad del mayor a 16 d.

Por otro lado, se han reportado estudios vinculados a la especie mexicana *T. globosa*; algunos de estos con resultados prometedores, puesto que se han encontrado en muestras analizadas una concentración de paclitaxel mayor comparados con otras especies (Tabla 2.6) (Shemluck *et al.*, 2003).

TABLA 2.6 Concentración de taxanos en especies de *Taxus* (base seca).

Especies de <i>Taxus</i>	Paclitaxel (% p/p)	Bacatina III (% p/p)
<i>T. globosa</i>	0.0121	0.0129
<i>T. baccata</i>	0.0088	0.0285
<i>T. brevifolia</i>	0.0081	0.0466
<i>T. cuspidata</i>	0.0077	0.0322
<i>T. media</i>	0.0056	0.0243
<i>T. floridana</i>	0.0060	0.0012

Fuente: Wheeler *et al.*, 1992; Shemluck *et al.*, 2003.

Entre los trabajos relacionados con la especie *T. globosa* localizados se encuentra una tesis Doctoral en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana en la cual reportan obtener una productividad de 130.347 $\mu\text{g/L día}^{-1}$ en la producción de paclitaxel mediante cultivos en suspensión de células inmovilizadas (Tapia, 2014). De igual manera, se reporta el aislamiento y elucidación estructural de un taxano y otros constituyentes de la corteza de *T. globosa*, esto en una tesis de Licenciatura en Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Guerrero, 1997).

2. ANTECEDENTES

En el 2006, Velásquez realizó estudios básicos sobre la producción de paclitaxel y bacatina III a partir de líneas celulares de *T. globosa*. Estas líneas fueron generadas dentro del Programa de investigación (multidisciplinario e interinstitucional) de investigación sobre producción de antitumorales por cultivo de células vegetales. Este programa ha dado origen a un banco de líneas celulares actualmente en el laboratorio de Bioingeniería del Tecnológico Nacional de México campus Veracruz. En el primer estudio de este programa (Barradas-Dermitz *et al.*, 2010), se reportó mayor producción de bacatina III en la línea proveniente de entrenudo, además, lograron cuantificar paclitaxel.

Las contribuciones científicas e ingenieriles permitieron en el 2012, el diseño de una planta piloto para estudios en la producción de taxoides en cultivos *in vitro* de *T. globosa* S., como parte de un proyecto de investigación de la licenciatura en IBQ del ITVer (Zavala-Ortíz, 2012).

El escalamiento de un proceso, es la etapa crucial para determinar si dicho proceso es técnicamente factible presentando altos rendimientos en producción. Para el cultivo de células vegetales en biorreactores se tienen tres grupos dependiendo del tipo de cultivo, estos pueden ser: células en suspensión, células inmovilizadas y reactores de biopelícula. Son diversos los factores que afectan estos procesos, desde el tipo de reactor utilizado, el medio de cultivo empleado (el cual varía de acuerdo a la línea celular), las condiciones del cultivo, el comportamiento de las células al formar agregados y la transferencia de oxígeno durante su cultivo.

La capacidad de las células al formar agregados durante el cultivo celular ha provocado algunas dificultades en cuanto al rendimiento de producción de los compuestos de interés, debido a la deficiencia que presentan ante la asimilación de nutrientes y oxígenos durante su cultivo. Este hecho promueve el estudio del tamaño de inóculos utilizados en los cultivos en suspensión y de los periodos de crecimiento al que se encuentran sometidos. Un caso particular es el estudio de producción de surfactina, en donde establecieron inóculos: primario y secundario, cada uno a tamaño y edades distintos. Los resultados sugieren que la interacción entre la edad del inóculo se puede usar como parámetro para mejorar el rendimiento y la economía del proceso (Ramkrishna & Swaminathan, 2004).

2. ANTECEDENTES

Los microorganismos son capaces de producir diversos metabolitos, en donde se ha demostrado que la productividad depende de la edad del inóculo y que el tamaño de inóculo tiene efecto en los rendimientos de cada experimento.

De los primeros estudios encontrados con respecto al tamaño y edad del inóculo en *Taxus*, fue el realizado por Wang, Zhong, & Yu, (1997), con *T. chinensis*. Este grupo de investigadores utilizaron tamaños de inóculo de 1.5-6.0 g peso seco/L afectando el crecimiento celular y a la acumulación de paclitaxel intracelular y extracelular. La concentración de paclitaxel extracelular fue relativamente más alta a tamaños de inóculo bajos 1.2 y 2 g DW/L.

Otro estudio fue el de Zhang, Wu, & He, (2002), con cultivos en suspensión de *T. yunnanensis* en el cual concluyeron que la productividad de la biomasa en el periodo de producción se vio incrementada con el tamaño de inóculo, pero disminuyó con la edad del mismo; el rendimiento volumétrico y la productividad de paclitaxel reportado también aumentaron con el tamaño de inóculo, mientras que el rendimiento específico de este taxano dependió principalmente de la edad del inóculo.

Alvarado-López, (2014), dentro de los primeros estudios de producción de paclitaxel y bacatina III con líneas celulares de *Taxus globosa*, evaluó tamaños de inóculos y concluyó que la producción de paclitaxel bacatina III está directamente relacionada con el tamaño de inóculo y a edades tempranas (6 d) se obtuvieron los picos de producción más altos, esto podría deberse al estrés producido por el subcultivo al inicio de la cinética, que activa de algún modo su producción. Estos estudios revelan que la concentración de taxoides varía de acuerdo a la especie o variedad del cultivo del tejo probado, se ha demostrado que el contenido de paclitaxel disminuye cuando el tamaño de los agregados celulares aumenta.

2.4 Cultivo de células vegetales *in vitro*

Durante mucho tiempo las plantas han sido utilizadas como materia prima para la extracción de un sin fin de compuestos, los cuales en su mayoría han sido aprovechados como medicamentos, antibacteriales, colorantes, saborizantes, fragancias, entre otros usos (Tabla 2.7). La obtención de algunos de estos compuestos se ha logrado realizar a través de síntesis

2. ANTECEDENTES

química; sin embargo, este proceso presenta varias desventajas, una de ellas es la complejidad y el número de etapas involucrados en este proceso, además, la poca concentración que presentan algunos metabolitos en las plantas sugiere una alternativa que promuevan su producción a escala industrial (Raskin *et al.*, 2002).

TABLA 2.7 Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica extraídas de especies vegetales.

Metabolito	Uso	Especie de planta	Costo (US/kg)
Ajmalicina	Antihipertensivo	<i>Catharanthus roseus</i>	37,000
Artemisina	Antimalaria	<i>Artemisia annua</i>	400
Berberine	Dolencia intestinal	<i>Coptis japonica</i>	3,250
Camptotecina	Antineoplásico	<i>Camptotheca acuminata</i>	432,000
Capsaicina	Contraírritante	<i>Capsicum frutescens</i>	750
Colchicina	Antitumoral	<i>Colchium autumnale</i>	35,000
Digoxina	Cardiotónico	<i>Digitalis lanata</i>	3,000
Ellepticina	Antitumoral	<i>Orchrosia elliptica</i>	240,000
Morfina	Sedativo	<i>Papaver somniferum</i>	340,000
Shikonina	Antibacterial	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	4,500
Paclitaxel (taxol)	Anticancerígeno	<i>Taxus brevifolia</i>	600,000
Vincristina	Antileucémico	<i>Catharanthus roseus</i>	1,000,000
Vinblastina	Antileucémico	<i>Catharanthus roseus</i>	2,000,000

Fuente: propia a partir de Ramachandra & Ravishankar, 2002.

El cultivo *in vitro* de células vegetales representa una de las alternativas para la obtención de metabolitos, esto es, porque tiene algunas ventajas sobre los cultivos tradicionales, especialmente en algunas especies de plantas como las del género *Taxus*, que son silvestres y requieren largos periodos de cultivo. Además, se tienen mejores condiciones de cultivo, lo que promueve una mayor calidad y un mejor rendimiento en los mismos. Sin embargo, para llevar este procedimiento a escala industrial falta resolver varios problemas como el

2. ANTECEDENTES

crecimiento lento, la inestabilidad genética y baja productividad de los compuestos de interés (Sajc, Grubisic, & Vunjak-Novakovic, 2000).

El crecimiento y desarrollo celular en los vegetales se ven influenciados por factores como las hormonas, la luz, la temperatura, la gravedad, la depredación por insectos, las enfermedades, e inclusive la interacción entre las mismas células. Los procesos de división y elongación celular presentan totipotencia, es decir, poseen la capacidad de generar un individuo completamente idéntico a la célula madre; estas células hijas poseen la misma información genética y las mismas funciones al de la célula original. Sin embargo, algunas especies de plantas tienen un lento crecimiento debido a su estado fisiológico, el cual se ve afectado por los cambios ambientales (Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, 2005; Universidad Nacional del Nordeste UNNE, 2014).

Existen tres formas de cultivar tejidos vegetales *in vitro*: en suspensión, de células inmovilizadas y de órganos. Esto depende del tipo de biorreactor que se utilice y de la especie a la cual se encuentra sometido el estudio.

Los cultivos de tejidos vegetales son propensos a alteraciones genéticas debido al estrés inducido por las condiciones de cultivo *in vitro* y el modo de regeneración, “esta variabilidad genética ha estado asociada con el genotipo, el tipo de explante, la composición del medio de cultivo, la forma de regeneración, entre otros factores”. De acuerdo a Jadán *et al.*, (2017), existe la posibilidad de que en la especie *Taxus globosa* S., posea una tasa de mutación alta. Debido a esto, se requiere como análisis complementario el estudio de la estabilidad genética a fin de conocer su comportamiento, luego de haber sido sometido a condiciones específicas para promover su crecimiento (González *et al.*, 2007; Yin, *et al.*, 2013 citado en Jadán *et al.*, 2017).

2.4.1 Cultivo de líneas celulares en suspensión

El cultivo de células o tejidos suspensión consiste en la agregación de células en un medio líquido, donde éstas son distribuidas homogéneamente en el medio de cultivo, facilitando la transferencia de nutrientes y oxígeno en las células. Este tipo de cultivo permite el control relativamente sencillo de variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto; sin embargo,

2. ANTECEDENTES

pueden verse modificadas algunas características de las células presentes en las plantas como su diferenciación y la comunicación intercelular, lo que implica en muchos casos la disminución en la producción de metabolitos secundarios (Schlatmann, Hoopen, & Heijnen, 1996; Hellwig *et al.*, 2004).

La fase en la cinética de crecimiento celular que más se aproxima a las condiciones naturales durante el cultivo en suspensión de células vegetales es la fase estacionaria, en la cual se ha reportado un cierto grado de diferenciación, observándose que la acumulación de metabolitos secundarios se presenta principalmente durante este periodo; sin embargo, existen casos en los que metabolitos asociados al crecimiento, presentan acumulación proporcional a la producción de biomasa observados durante la fase exponencial en ciertas líneas celulares, tales son los casos de la producción de betalainas, carotenoides y azadiractina (Bourgaud *et al.*, 2001; Sricastava & Prakash, 2006; Arias *et al.*, 2009).

“En la actualidad, se conocen pocos procesos industriales para la producción de metabolitos secundarios utilizando esta estrategia de cultivo; algunos de los procesos exitosos han sido la obtención de shikonina por suspensiones celulares de *Lithospermum erythrorhizon* y berberina a partir de suspensiones de *Coptis japonica* por la empresa japonesa Mitsui Petrochemical Industries Ltd., la obtención de extractos de la planta *Panax ginseng* en reactores de hasta 25000 litros por la empresa japonesa Nitto Denko Corporation y finalmente la obtención de paclitaxel, una droga anticancerígena obtenida de suspensiones celulares de especies del género *Taxus* por la empresa Alemana Phyton hasta volúmenes de 75000 litros” (Arias *et al.*, 2009).

2. ANTECEDENTES



FIGURA 2.6 Variables que afectan la producción de taxanos en cultivos celulares de *Taxus*.

Las variables de entrada (Fig. 2.6) en los cultivos en suspensión celular tales como, la selección de líneas celulares, el medio y las condiciones de cultivo, el empleo de elicidores y precursores de crecimiento, así como el diseño del reactor, los procesos de aislamiento y purificación de los compuestos de interés; definen en gran medida el éxito de los procesos industriales (Zhang *et al.*, 2004).

La preparación de suspensiones celulares puede tener tasas relativamente rápidas de propagación que son posibles con el cultivo de brotes de algunas especies vegetales; sin embargo, la velocidad a la que puede propagarse depende de la velocidad a la que se pueden cultivar y subdividir los callos, se puede lograr una tasa de multiplicación mucho más rápida iniciando un cultivo en suspensión a partir de callos competentes. Después de ser aumentados por el cultivo, las células o los agregados celulares pueden ser utilizados para producir nuevas colonias de callos regenerativos. Los reguladores del crecimiento juegan un papel importante en estos procesos de propagación celular pues favorecen la formación de una suspensión celular dispersa; sin embargo, pueden hacer que las células pierdan su capacidad

2. ANTECEDENTES

morfogénica, también existe el problema de que, al prolongar el período de propagación, aumente la variabilidad genética dentro de la línea celular (George *et al.*, 2008)

De aquí que los medios líquidos sean esenciales para los cultivos en suspensión, los cuales se prefieren para experimentos críticos sobre la nutrición, el crecimiento y la diferenciación celular en los tejidos callosos, para la producción de compuestos bioactivos de interés comercial. Además, de ser sistemas adecuados para el estudio de rutas biosintéticas de estos compuestos permitiendo aislar enzimas involucradas en la vía metabólica y de esta manera dilucidar los factores regulatorios del metabolismo a nivel genético.

2.5 Justificación

El paclitaxel, es un metabolito secundario del género *Taxus* utilizado en la industria farmacéutica por su capacidad de provocar la muerte de células cancerosas. En México, no se ha desarrollado un proceso de producción de taxanos que permita la disponibilidad de este compuesto a gran escala debido a diversas limitaciones que afectan estos procesos, entre ellas podemos citar: el tipo de reactor utilizado, el medio de cultivo empleado (el cual varía de acuerdo a la línea celular), las condiciones del cultivo, la línea celular, el uso de reguladores de crecimiento y elicitadores entre otros.

Generar y caracterizar nuevas líneas celulares de *T. globosa* contribuye en el desarrollo de nuevos procesos y en la mejora de las condiciones que permitan obtener mayores rendimientos en los cultivos en suspensión. Una de las desventajas que tienen estos sistemas es la baja estabilidad y durabilidad de esta especie durante los cultivos en suspensión en reactores.

Es por ello que el generar y obtener nuevas líneas celulares obtenidas de distintos explantes permitirá optimizar las condiciones de cultivos para la producción de taxanos. Generará mayores conocimientos sobre el cultivo *in vitro* de *T. globosa* y eventualmente se tendrá la posibilidad de desarrollar un proceso para la producción industrial de paclitaxel.

2.6 Objetivos

2.6.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar nuevas líneas celulares de *T. globosa*, estableciendo cinéticas de crecimiento celular y producción de taxanos.

2.6.2 Objetivos específicos

- Generar nuevas líneas celulares de *T. globosa*, seleccionadas a partir de los explantes que presente la mejor respuesta de biomasa.
- Caracterizar la cinética de crecimiento y producción de paclitaxel y baccatina III bajo condiciones controladas.
- Evaluar el efecto del empleo de reguladores de crecimiento en la producción de paclitaxel y baccatina III.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

3.1.1 Generación de líneas celulares

El cultivo de tejidos vegetales permite realizar un explante directo del árbol del cual se tiene interés de aislar células para su consecuente estudio. En este trabajo se realizó el aislamiento de tejidos del árbol del tejo para estudios cinéticos en la producción de taxanos.



FIGURA 3.1 Ejemplar y explantes de *Taxus globosa* Schtdl. **A.** Ejemplar localizado en el Pinal-Encinal, Xalapa, Ver.; **B.** Hojas y tallos durante el proceso de esterilización; **C.** Explantes de tallos con brotes de callo en medio de inducción.

La generación de nuevas líneas celulares dio inicio en abril 2019 (Figura 3.1) con el proceso de esterilización de los explantes tomados de árboles localizados en zonas montañosas del

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Pinal-Encinal, localidad de la ciudad de Xalapa, Ver. y el Alto Pixquiac, perteneciente al municipio de Acajete, Ver. Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Martín Mata Rosas, jefe del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del INECOL (Instituto de Ecología) e integrante del Programa de investigación (multidisciplinario e interinstitucional) sobre la producción de antitumorales por cultivo *in vitro* de células vegetales.

El protocolo de esterilización de los explantes vegetales comienza con la recolección de las muestras del árbol de *Taxus globosa*, de las muestras colectadas se retiraron los brotes nuevos los cuales fueron depositados en una jarra de 2 L y llevados al lavabo donde se pusieron bajo el chorro de agua durante 10 min. A continuación, los explantes fueron depositados en un recipiente en el cual contenía una solución jabonosa y se mantuvo en agitación durante 30 min con ayuda de un agitador orbital. Una vez transcurrido el periodo de lavado, el material vegetal fue transferido a un frasco con agua estéril para su enjuague (3 veces), las muestras fueron llevadas a un frasco estéril que contenía una solución fungicida (Amistar 1g/L) adicionado con 10 gotas de microdyn por litro de solución, se mantuvo en agitación durante 1 h. Después, los brotes se hacen pasar a un frasco estéril y se adiciona alcohol etílico al 70% dejando actuar durante 1 min, al término de esta etapa los explantes son llevados a un frasco estéril con una solución de cloro al 20% adicionado con Tween 80 (2 gotas/100 mL), se mantiene en agitación constante durante 20 min y se lleva a la campana de flujo laminar. Los explantes son enjuagados con agua estéril cada 5 min en la campana de flujo laminar, se mantienen los brotes en el agua del último enjuague.

De las pequeñas poblaciones de árboles del tejo entre jóvenes y viejos localizadas, se observó que en algunos árboles de edad adulta presentaban pequeños brotes de semillas y una floración limitada. Del árbol en general, se recolectaron ramas jóvenes de aproximadamente 30 cm de longitud, una vez concluido el proceso de esterilización se realizaron pequeñas incisiones las cuales fueron introducidos en frascos de cristal con medio nutritivo para promover el crecimiento celular. Los explantes diseccionados en hojas, tallos y meristemas, fueron aislados y colocados en medio de inducción. Todos los explantes fueron sembrados en frascos de cultivo de 100 mL y llevados al cuarto de incubación en oscuridad a 25 °C.

El medio de inducción de cultivo Gamborg B5 (1968) fue suplementado con dos veces la concentración de vitaminas y 30 g/L de sacarosa, gelificado con 5 g/L de agar (TC Gel). Se

3. MATERIALES Y MÉTODOS

realizaron dos tratamientos con diferentes concentraciones y reguladores de crecimiento los cuales fueron etiquetados como AP1 y AP2, para los tejidos recolectados en la zona del Alto Pixquiac; los tratamientos M1 y M2 para los recolectados en el Pinal-Encinal, Xalapa, Ver (Tabla 3.1). Como medio de cultivo para el mantenimiento de las líneas celulares y durante los estudios cinéticos se empleó el medio Gamborg B5 modificado ITV-Anc (Tabla 3.2).

TABLA 3.1 Concentración de reguladores de crecimiento.

Alto Pixquiac, Acajete, Ver.			
Tratamiento AP1		Tratamiento AP2	
2,4-D	4.42 mg/L	ANA	2 mg/L
Kin	0.86 mg/L	BAP	0.05 mg/L
GA ₃	0.346 mg/L		
Pinal-Encinal, Xalapa, Ver.			
Tratamiento M1		Tratamiento M2	
2,4-D	4.42 mg/L	ANA	2 mg/L
Kin	0.86 mg/L	BAP	0.05 mg/L
GA ₃	0.346 mg/L		

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Cinetina (Kin), Ácido giberélico (GA₃), Ác. α -naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

TABLA 3.2 Composición de medios Gamborg B5 empleados (modificado ITV-Anc).

Componente	Gamborg B5 (GB5) mg/L o ppm	Gamborg B5 modificado ITV (GB5) mg/L o ppm	Gamborg B5 modificado ITV-Anc (GB5) mg/L o ppm
Macronutrientes			
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	134	134
CaCl ₂ .2H ₂ O	150	150	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	246	246	122.09
KNO ₃	2528	2528	2500
Micronutrientes			
H ₃ BO ₃	3	3	3
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
MnSO ₄ .H ₂ O	10.0	10.0	10.0
KI	0.75	0.75	0.75
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150	150	130.42
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2	2	2
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.2	37.2	37.3
Aditivos orgánicos comunes			
Mio-inositol	100	100	100
Piridoxina.HCl (vit)	1	2	1
2,4-Diclorofenoxiacético o 2,4-D	0.55	0.55	*4.42
Sacarosa	20 g	20 g	30 g
Ác. Nicotínico (vit)	1	2	1
Tiamina HCl (vit)	10	20	10
Cinetina	0.1		*0.86
Glicina		30	
Ác. Giberélico p GA ₃			*0.346
6-Bencilaminopurina o BAP			**0.05
Ác. α-naftalenacético o ANA			**2

*Tratamiento 1: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Cinetina (Kin), Ácido giberélico (GA₃). **Tratamiento 2: α-naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron soluciones patrón con la composición indicada en la tabla 8., se agrega la sacarosa grado 1 (Merck-México, 7651) para tener una concentración final de 30 g/L y se diluye con agua destilada, se ajusta a pH 5.7, gelificado con 5 g/L de agar (TC Gel) y se esteriliza por 20 min a 121 °C y 1.5 psi. Una vez preparado el medio, se deja dentro de la campana de flujo laminar con la aplicación de luz UV durante 15 min para garantizar esterilidad. A continuación, el medio fue vertido en frascos de cristal de 100 mL en los cuales se llevó a cabo la siembra de los explantes colectados y esterilizados. Se mantuvieron en condiciones asépticas a 25 °C y en oscuridad.

La generación de callos fue evaluada de acuerdo a la escala propuesta por Santana (1982), el cual teniendo en cuenta el porcentaje de callos formados y su desarrollo, así mismo, su coloración y consistencia presenta los siguientes niveles:

Grado 0.- No presenta formación de callos.

Grado 1.- Presenta ligera formación de callos (débil proliferación de en zona de los bordes del explante).

Grado 2.- Formación del callo (presenta proliferación de células por todos los bordes del explante, sin llegar a la formación de una masa).

Grado 3.- Presenta abundante formación de callos (se tiene una formación de masa voluminosa de células).

$$\text{Callos formados (\%)} = \frac{\text{No. explantes con callos por tratamiento}}{\text{No. total de explantes por tratamiento}} \times 100$$

Los tejidos fueron subcultivados periódicamente cada 15 días e incubados en oscuridad a 25 °C. Una vez generado suficiente callo del explante, éste fue retirado y transferido a un nuevo frasco con medio fresco (Gamborg B5-Anc) para evaluar su resistencia a la contaminación y estimular el crecimiento de los callos. Transcurrido algunas semanas se obtuvo suficiente biomasa de callo friable capaz de establecer las suspensiones celulares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.2 Cultivo de células vegetales en suspensión

Las suspensiones celulares se inician generalmente mediante la incubación de trozos de callos friables en medios líquidos que están en movimiento continuo. Se emplean matraces Erlenmeyer en los cuales se deposita el medio líquido con los trozos de callos dispersos en él, hasta llenar aproximadamente 1/5 de la capacidad de los matraces, se ponen a incubar en un agitador rotatorio a 80-150 rpm, en obscuridad continua a 25°C. Mediante cultivos semanales, las suspensiones celulares quedan establecidas después de varios días.

Se llevó a cabo una serie de experimentos por duplicado (a nivel matraz), donde se caracterizaron cinéticamente las líneas celulares generadas: hoja, tallo y meristemo, provenientes de las regiones montañosas del Alto Pixquiac y el Pinal-Encinal, Xalapa, Ver., empleando dos tratamientos para cada caso (Tabla 6). Los cultivos celulares se establecieron a partir de callos friables de cada una de las líneas aisladas de *T. globosa* S., inicialmente estos callos (1 g BH) fueron sembrados en matraces de 50 mL los cuales contenían 10 mL de medio Gamborg's B5 suplementado con reguladores de crecimiento correspondientes a cada tratamiento empleado (AP1, AP2, M1 y M2). Los cultivos se mantuvieron en agitación 120 rpm a 25°C en condiciones de obscuridad durante 15 días hasta obtener suficiente biomasa para los consecuentes experimentos.

Se seleccionaron las líneas celulares bajo los siguientes criterios: debe presentar resistencia a la contaminación y al crecimiento microbiano, la coloración del callo previo al cultivo en suspensión debe ser amarillento claro, presentar crecimiento activo de biomasa vegetal de la especie en cuestión, además, tener viabilidad celular positiva; para esto se realizaron cinéticas de crecimiento de células vegetales, esto permitió conocer el comportamiento de las líneas previamente generadas y su consecuente selección como objeto de estudio; con esto y una vez seleccionada la línea celular se procedió al establecimiento de la suspensión celular, promoviendo un ambiente de cultivo uniforme para las células vegetales en suspensión.

Los cultivos de la línea celular fueron llevados a suspensión el cual fue establecido a partir de callos friables y de color amarillento claro, se inocularon 10 g de callo el cual fue depositado en un matraz de 250 mL que contenía 100 mL de medio (100 g/L) con sus respectivos reguladores de crecimiento, manteniéndose en las mismas condiciones antes

3. MATERIALES Y MÉTODOS

descritas. Se realizaron cinéticas de crecimiento para el estudio de la influencia de los reguladores de crecimiento en la producción de paclitaxel y bacatina III.

Se empleó un sistema de cultivo cerrado, el cual se caracteriza debido que las células se encuentran en el medio de cultivo aumentando de esta manera su densidad celular, previo a alcanzar la fase estacionaria, se retira el medio “agotado” y posteriormente se suministra medio fresco, de esta manera se reinicia el ciclo de crecimiento.

3.1.3 Técnica de mantenimiento de los cultivos celulares

Subcultivar promueve la generación de nueva población celular y con ello se mantiene la viabilidad. Para este caso en particular, en un periodo de 15 días se detuvo la agitación del recipiente que contenía el cultivo original con el fin de sedimentar la biomasa presente. En campana de flujo laminar se retiró el sobrenadante (medio nutritivo agotado sin células) por succión con pipeta automática autoclavable (Labpette Discovery, cat no P3960-10000A) y después se adicionó medio fresco estéril, seguido de esto se incubó nuevamente por periodos de 15 días más a 25 °C y 120 rpm.

Cada vez que se llevó a cabo el subcultivo, se tomaron muestras en viales para su consecuente análisis de viabilidad y conteo celular con ayuda de tinción por azul de Evans.

3.2 Estudio cinético de las líneas celulares

El muestreo consistió en tomar dos alícuotas de 1 mL del cultivo los cuales fueron depositados en viales de microcentrífuga (uno de ellos a masa conocida, etiquetado como “A”) para análisis de biomasa húmeda y seca, el segundo (B) para viabilidad celular. Las muestras fueron centrifugadas a 21,000 g (Eppendorf 5424) durante 23 min. Del vial A se tomaron 500 µL de sobrenadante y fue depositado en un tubo para microcentrífuga Eppendorf para su consecuente análisis de sustratos, una vez tomada la alícuota se retira el exceso de sobrenadante dejando sólo el paquete celular para análisis de biomasa húmeda por gravimetría, estos viales fueron secados en una estufa de vacío (75 °C, 1,000 mbar de presión

3. MATERIALES Y MÉTODOS

absoluta) (ShellLab 1410) hasta tener peso constante para el registro de biomasa seca. Este proceso se realizó igualmente para todas las líneas con sus respectivos tratamientos y réplicas.

Por otra parte, se tomó una alícuota de 800 μ L del sobrenadante del segundo vial (B) para el análisis de productos (paclitaxel y bacatina III), posteriormente se retiró el exceso de sobrenadante permitiendo el contenido del paquete celular en un volumen de 100 μ L para el análisis de cuenta celular por microscopía. Para ser posible la cuenta viable se utilizó el método de tinción azul de Evans al 0.2% (p/v) en una relación 1:1. Este procedimiento y los descritos anteriormente se realizaron en cada muestreo y con las líneas celulares establecidas.

3.3 Determinaciones analíticas

3.3.1 Determinación de biomasa

La determinación de la biomasa generada en los cultivos en suspensión de células de *T. globosa* se llevó a cabo tomando muestras en cada una de las experimentaciones las cuales fueron depositados en viales de microcentrífuga a masa conocida para análisis de biomasa húmeda y seca por gravimetría.

En cada uno de los experimentos para establecer la línea celular de estudio, la biomasa se determinó mediante la metodología antes descrita. Se tomaron muestras de los cultivos (1 mL) y fue depositado en viales de microcentrífuga (a masa conocida). Las muestras fueron centrifugadas a 21,000 g (Eppendorf 5424) durante 23 min, se retiró el exceso de sobrenadante dejando sólo el paquete celular para análisis de biomasa húmeda por gravimetría (Ohaus, mod. PX224/E), estos viales fueron secados en una estufa de vacío (75 °C, 1,000 mbar de presión absoluta) (ShellLab, 1410) hasta tener peso constante para el registro de biomasa seca. Este proceso se realizó igualmente para todas las líneas con sus respectivos tratamientos y réplicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.2 Conteo celular y viabilidad

La determinación del número de células se lleva a cabo utilizando una cámara de Neubauer-Improved (Fig. 6), en donde para evaluar la viabilidad celular se utilizó la tinción con azul de Evans, un colorante no permeable en células vivas y con baja toxicidad para las células. El principio de esta técnica consiste en determinar el número relativo de células muertas en cultivos de células en suspensión, puesto que las células muertas son teñidas de manera selectiva con el azul y las células vivas no presentan esta coloración (Gaff & Okong'o-Ogola, 1971; Song *et al.*, 1999)

La tinción azul de Evans consistió en adicionar un volumen de esta solución al 0.2% (p/v) por el mismo volumen de muestra, es decir, en una relación 1:1 y procediendo al conteo celular en cámara de Neubauer-Improved por duplicado (Fig. 3.2). Por cada cuadrícula se tomó una alícuota de 20 μL con pipeta automática (Accumax Pro) para ingresar la muestra por capilaridad a la cámara. Con los resultados obtenidos del conteo se calculó el porcentaje de viabilidad y la cantidad de células viables por mL de muestra.

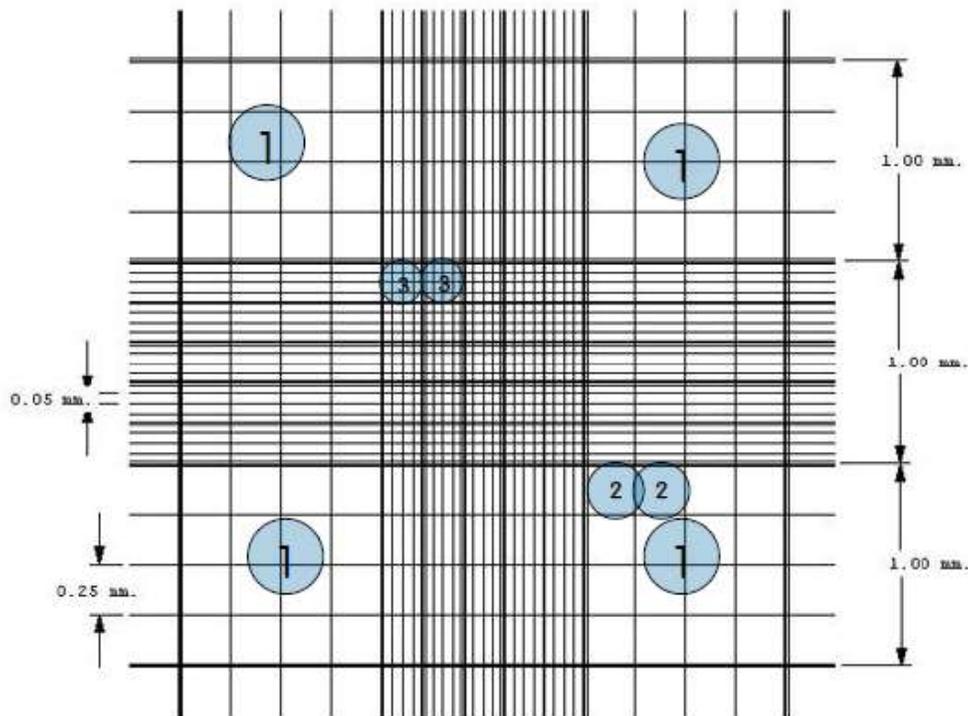


FIGURA 3.2 Detalles la rejilla de la cámara de Neubauer mejorada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Concentración celular:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = N \times 10^4 \times d$$

Donde; N corresponde al promedio de células presentes en 1 mm^3 ($0.1 \mu\text{L}$), 10^4 es el factor de conversión de $0.1 \mu\text{L}$ a 0.1 mL y d es el factor de dilución.

Células contenidas en la suspensión original:

$$\text{Células totales} = \text{Conc. celular} \times \text{Volumen total}$$

Porcentaje de viabilidad celular:

$$\% \text{Viabilidad} = \frac{\text{No. de células vivas}}{\text{No. células totales}} \times 100$$

Los viales para microcentrífuga (etiquetados como B) que contenían 1 mL de muestra de los cultivos, fueron centrifugados a $21,000 \text{ g}$ (Eppendorf 5424) durante 23 min ; se toman $800 \mu\text{L}$ del sobrenadante y fueron depositados en viales para su consecuente análisis de productos, posteriormente se retira el exceso de sobrenadante permitiendo el contenido del paquete celular en un volumen de $100 \mu\text{L}$ para su análisis por microscopía. Este paquete celular es sometido a un baño ultrasónico (Ultrasonik Ney 28H) por 15 min previo a la observación en microscopio para cada uno de los experimentos.

Para el conteo de células se tomó en cuenta el número de células contenidas en los 9 cuadros de $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ de la cámara. Se consideró como volumen de y profundidad de la cámara de 0.9 mm^3 y 0.1 mm , respectivamente.

3.3.3 Cuantificación de sustratos y productos

La cuantificación de glucosa como sustrato presente en el medio de cultivo, se llevó a cabo mediante una hidrólisis ácida previa con $\text{HCl } 4\text{M}$ y su consecuente análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Las muestras tomadas del vial microcentrífuga A fueron centrifugadas a $21,000 \text{ g}$ (Eppendorf 5424) durante 23 min , se tomó $500 \mu\text{L}$ de sobrenadante y fue depositado en un tubo Eppendorf en el cual se adicionó

3. MATERIALES Y MÉTODOS

500 μL HCl 4M, las muestras fueron llevadas a una estufa de calentamiento a 60 °C durante 20 min para hidrolizar los azúcares; una vez transcurrido el tratamiento de hidrólisis las muestras son atemperadas y se adiciona 125 μL de BaO 0.3M – 125 μL de ZnSO₄ 5% p/v, una vez hecho esto se agita con ayuda del vortex y se deja reposar por 10 min, las muestras son centrifugadas (10 000 rpm/11200 g durante 10 min), el sobrenadante es retirado y filtrado (filtros nylon 0.45 μm) directamente en viales para cromatografía, todas las muestras fueron analizadas por HPLC (Waters 600 TPS Spectra System, Waters, Milford, MA) utilizando una columna Shodex SH1011 8 A-300 mm (H203153, Japón), a 50 °C, con H₂SO₄ 0.5 M como fase móvil con un flujo de 0,6 mL/min y un detector de índice de refracción (waters 2414, TPS Refracto Monitor V, Waters, Milford, MA, USA).

La cuantificación de metabolitos (paclitaxel y bacatina III) se lleva a cabo mediante un análisis cromatográfico (HPLC). Las muestras de sobrenadante libres de células (resultado de la centrifugación) son liofilizadas (Labconco free tune 4.5) y posteriormente resuspendidos en metanol acidificado (0.01% de AcOH glacial para la estabilización de taxanos). Posteriormente se realiza una ultrasonicación por 60 minutos, el extracto obtenido es centrifugado a 16,000 g durante 15 min y el sobrenadante obtenido se filtra (filtro fluoruro de polivinilideno PVDF de 0.2 μm) para proceder con su análisis por HPLC o CLAR.

Las condiciones del método utilizado son las siguientes:

Fase estacionaria: Altima Phenyl Rocket

Fase Móvil: CF₃COOH 0.5M:CH₃OH:CH₃CN, 50:19:31 v/v/v

Temperatura: 30 °C

VFV = 1.5 mL/min

Detector: UV (λ = 230 nm)

Las ecuaciones de calibración utilizadas para medir taxanos determinadas a partir de diluciones de estándares con concentraciones desde 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los analitos de interés; se presentan a continuación:

$$Y = 1.13 \times 10^4 X - 5.05 \times 10^3 \quad R^2 = 0.993 \quad t_r = 1.870 \text{ min}$$

$$Y = 1.86 \times 10^4 X - 8.12 \times 10^3 \quad R^2 = 0.996 \quad t_r = 3.396 \text{ min}$$

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.4 Rendimiento de producto

En base a los resultados obtenidos durante la experimentación se determina el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato, así mismo, el rendimiento de biomasa con respecto a la producción de taxanos.

Rendimiento biomasa-sustrato:

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_o}{S_f - S_o}$$

Rendimiento producto-biomasa (específico):

$$Y_{p/x} = \frac{P_f - P_o}{X_f - X_o}$$

3.3.5 Velocidad específica de crecimiento y de formación de productos

La velocidad de crecimiento máxima de biomasa se encuentra definida bajo la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt}$$

Y la velocidad específica de formación de productos (paclitaxel y bacatina III) por la siguiente ecuación:

$$v_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$$

3.3.6 Tiempo de duplicación

El tiempo de duplicación t_d de la biomasa se encuentra expresada por la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{max}}$$

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4 Efecto del empleo de reguladores de crecimiento en la producción de paclitaxel y bacatina III.

La evaluación del empleo de reguladores de crecimiento para la producción de paclitaxel y bacatina III se realizó una vez generados los cultivos en estado sólido (callos), a partir de los cuales se establecieron los inóculos de los cultivos celulares de *T. globosa*.

Se estudiaron líneas de hoja, tallo y meristemo, los cuales fueron sometidos a tratamientos AP1 y AP2. Cabe señalar que estas líneas provienen de la zona montañosa del Alto Pixquiac, Acajete, Veracruz. Estos experimentos se llevaron a cabo a nivel matraz 250 mL con un volumen de trabajo de 100 mL, para la inoculación del reactor se requirió de 10 mL de paquete celular (PCV) aproximadamente 1 g de biomasa húmeda, inoculado en 990 mL de medio Gamborg B5 suplementado con 2,4-d (4.42 mg/L), Kin (0.86 mg/L), GA3 (0.346 mg/L) y 30 g/L de sacarosa.

Las condiciones de cultivo establecidas fueron las siguientes:

Temperatura: 25±1 °C

Agitación: 120 rpm

Obscuridad

Se estableció la mejor línea celular productora de paclitaxel y bacatina III, esta etapa consistió en la caracterización cinética y estequiométrica de la línea celular, con esto se determinó la capacidad de la línea de producir concentraciones de biomasa y taxanos, con las condiciones antes establecidas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Generación de nuevas líneas celulares de *T. globosa*.

4.1.1 Generación de las líneas celulares

Se generaron un total de 54 y 58 frascos con tejido vegetal proveniente de la zona montañosa el Pinal-Encinal y el Alto Pixquiac, localidades de los municipios de Xalapa, Ver. y Acajete, Ver., respectivamente. Se determinó el porcentaje de callos formados para ambas zonas teniendo como resultado 44.64% y 58.62%, observándose de esta manera una mejor respuesta en los explantes provenientes del Alto Pixquiac.

Entre las características morfológicas de los callos generados, a partir de la segunda semana de incubación se observó una ligera formación de callos en los cultivos (grado 1), a pesar de no presentar características morfogénicas favorables para la embriogénesis ni organogénesis, indicó el inicio a la morfogénesis indirecta (callogénesis).

Los callos de grado 2, fueron de color amarillo y consistencia compacta, los de grado 3 de la escala en el cultivo de *Taxus globosa*, se apreciaron de color crema amarillo, consistencia friable y apariencia nodular, indistintamente del tipo de tratamiento al que fueron sometidas las muestras; la clasificación de los cultivos fue definida por el crecimiento y las características morfológicas del callo según la escala de Santana, 1982 (Fig. 4.1).

Durante la etapa de incubación (obscuridad, 25 °C) se observó la generación de callos a partir de los primeros doce días, sin embargo, fue hasta la cuarta semana cuando se registraron frascos con callos de grado 3 (proliferación de callos), los cuales son de gran valor práctico para iniciar con los estudios básicos, así mismo, para la iniciación de las suspensiones celulares y su consecuente producción de metabolitos secundarios.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



FIGURA 4.1 Generación de callos de acuerdo a la escala propuesta por Santana (1982): grado 1, grado 2 y grado 3, respectivamente.

Se observó la influencia que presenta el origen del explante puesto que este constituye el primer paso para la generación de las líneas celulares, se utilizaron hojas, tallos y meristemas para la proliferación callosa de los cultivos.

La selección de la línea celular de estudio se vio influenciada por la línea que presenta mayor velocidad de generación de callo, además de la resistencia a la contaminación por agentes externos y su rápida respuesta *in vitro*; se observó que los explantes provenientes de árboles jóvenes contaban con esta particularidad.

Cabe señalar que los explantes de la zona montañosa Pinal-Encina, Xalapa, Ver., presentaron un mayor porcentaje de contaminación con presencia de hongos (42.59%) (Fig. 4.2), esto podría deberse a que la técnica de esterilización empleada tiene como objeto eliminar los agentes patógenos externos, sin embargo, aún pudieran haber persistido aquellos que se encuentran en el interior del tejido como es el caso de hongos endógenos; además, que la respuesta de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

desarrollo y la edad ontogénica de los mismos, de las pequeñas variaciones de la composición de los medios y los reguladores de crecimiento empleados.

Es difícil lograr la generación de cultivos celulares completamente estériles; por ejemplo, es probable que los virus u hongos presentes en el explante persistan en los cultivos. Por lo anterior, es necesario darle seguimiento a los protocolos de asepsia que van desde un adecuado ambiente de trabajo, la esterilización de los medios de cultivo y la desinfección de los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos, así mismo, una adecuada técnica de siembra de los tejidos vegetales.

Por otro lado, los explantes provenientes del Alto Pixquiac, Acajete, Ver., presentaron bajo porcentaje de contaminación (12%), esto puede deberse a que las muestras fueron recolectadas en su mayoría de árboles jóvenes cuando su capacidad de regeneración celular es óptima.



FIGURA 4.2 Contaminación por hongos en cultivos de *Taxus globosa*.

La callogénesis de los cultivos generados en este proyecto presentan comportamientos similares a los reportados por Tapia-Barrera, 2014., en el cual señala que el tiempo de duplicación obtenido en los cultivos de callos se encuentra dentro del rango de otras especies

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

vegetales del género *Taxus* que van desde 13 días (*T. baccata* y *T. media*) y 14 días (*T. media*) (Wickremesinhe y Arteca, 1993; Hirasuna *et al.*, 1996).

Una vez llegado al grado 3 de la escala descrita por Santana (1982), se llevó a cabo el establecimiento de las líneas celulares para su estudio en cultivos en suspensión. La selección de los cultivos se llevó a cabo teniendo en cuenta el porcentaje de callos formados, el desarrollo de los callos, color y consistencia, así como su resistencia a contaminación.

De manera preliminar podría decirse que los cultivos de la zona del Alto Pixquiac, Acajete, Ver., son los adecuados para llevar a cabo el estudio en suspensiones celulares, puesto que su porcentaje de contaminación es menor, además, en ambos tratamientos a los que fueron sometidos tuvieron un periodo de cuatro semanas para alcanzar el último nivel de generación de masa callosa del tejido vegetal. Sin embargo, se realizaron estudios cinéticos de cada una de las líneas generadas con sus respectivos tratamientos; con esto se seleccionaron las líneas celulares de meristemo AP1 y AP2 debido a que tuvieron mejores respuestas de acuerdo a su velocidad específica de crecimiento. Se observó que la línea celular de meristemo AP1 posee particularmente una mayor capacidad de regeneración celular, seguido de tallo AP1 y hoja AP1, aún con la hipótesis de que la línea celular de meristemo es la mejor productora de paclitaxel se realizaron los estudios cinéticos y estequiométricos para confirmar las sospechas.

4.1.2 Selección y establecimiento de las líneas celulares en suspensión

Al inicio de la generación de las suspensiones celulares, se puede observar grandes agregados y células libres, alargadas y de gran tamaño que no se dividen; pero después de repetir los subcultivos como se establecieron, es factible obtener una suspensión celular finalmente dispersa con alto ritmo de crecimiento.

Se observó que al usar una tasa de dilución baja utilizando cuatro partes de medio fresco por cada parte de suspensión celular, promueve su establecimiento de colonias celulares friables y de rápido crecimiento. Posteriormente se puede utilizar una tasa de dilución alta para su estudio cinético.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios cinéticos de las líneas celulares

Los estudios cinéticos de las líneas celulares aisladas fueron desarrollados después de un estudio preliminar, el cual permitió el establecimiento del estado fisiológico de los cultivos. Con esto se conocieron los periodos en los cuales las líneas celulares sufrían cambios en su estado de desarrollo.

En la figura 4.3 se puede observar de manera general el comportamiento cinético en la producción de biomasa de las líneas celulares aisladas sometidas al tratamiento AP1 y AP2. Se puede observar que presentan fases de retardo de aproximadamente 9 días, a partir de este punto se inicia la fase exponencial hasta los 21 días. De manera preliminar se puede decir que las líneas de hoja y meristemo AP1 pudieran presentar los mejores resultados en la producción de taxanos debido a su capacidad de regeneración celular, se definió que el inicio de la fase estacionaria en los cultivos ocurría a partir de los 24 días de cultivo, en este periodo la viabilidad celular se vio afectada, se sugiere realizar la resiembra de las líneas en este punto para evitar que entren en estado de senescencia.

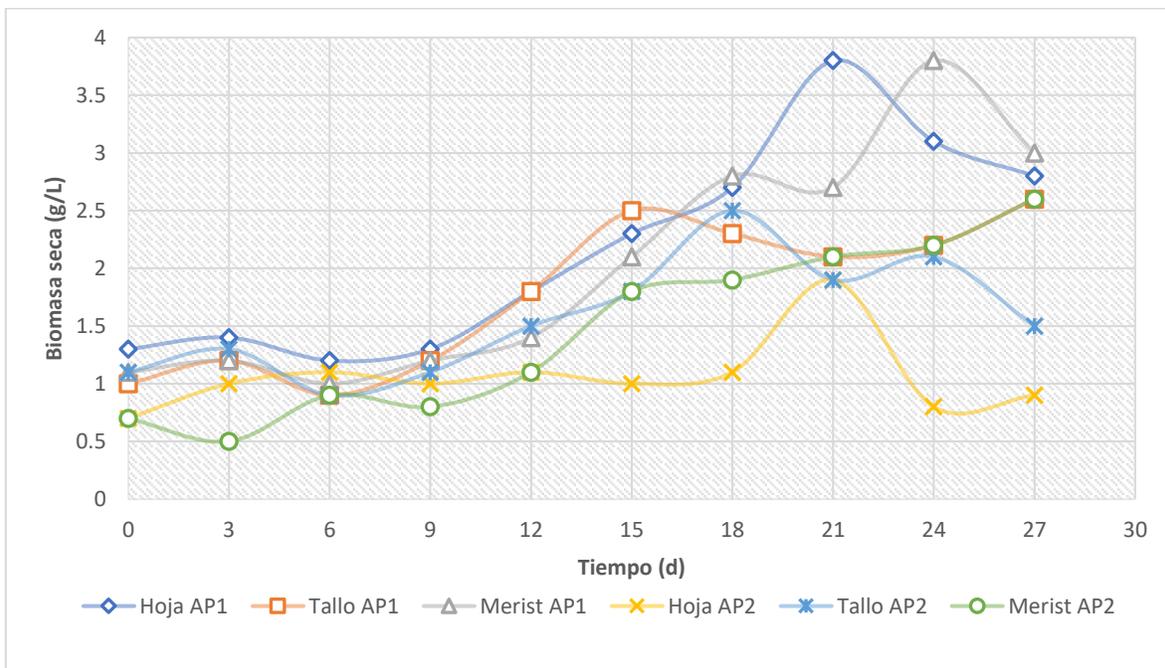


FIGURA 4.3 Perfiles cinéticos preliminares de producción de biomasa seca de líneas celulares de *Taxus globosa* S.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a la caracterización de las líneas, el seguimiento de la producción de biomasa se muestra en la figura 4.4 y 4.5, cabe señalar que el paquete celular contenido en los viales de microcentrífuga era pequeño, por lo que durante la extracción del sobrenadante parte de este pudiera haberse perdido lo que incrementaba el error experimental; además, se optó por el análisis de biomasa seca puesto que se observó que disminuía el error en los resultados.

Se observó que los cultivos provenientes de la zona del Alto Pixquiac, Xalapa, Ver., presentaban las fases de un comportamiento típico en su perfil cinético de la producción de biomasa. Los cultivos AP1 presentaron una mayor producción de biomasa alcanzando 3.8 g/L en base seca (3 veces mayor al reportado por Alvarado-López, 2014 y Zavala, 2015), con un tiempo de duplicación (t_d) de 5-7 días aproximadamente. Por el contrario, las líneas celulares AP2 presentan una fase de retardo que alcanza hasta los 18 días con una producción máxima de biomasa de 2.6 g BS/L; estas líneas presentan t_d que van de 3-7 días, sin embargo, los rendimientos $Y_{P/X}=1.519$ mg/g son menores comparados con los obtenidos en las líneas celulares de AP1.

El comportamiento cinético de la concentración de biomasa son características de los cultivos celulares en estas especies vegetales, los cuales suelen ser lentos y con cambios constantes (Fig. 4.4). Los cultivos AP1 presentan una fase de retardo de 6 días aproximadamente, después de este periodo se presenta un crecimiento logarítmico y consecuentemente una fase estacionaria, con esto se tienen establecidos los periodos de cultivos de 21 días para evitar el efecto de la muerte celular. Se puede observar la concentración máxima de biomasa en base seca que alcanzaron los cultivos AP1, superiores a los comparados con los obtenidos en tratamiento AP2, además los tiempos de duplicación fueron relativamente bajos, comparables con los reportados por Tapia-Barrera, (2014).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

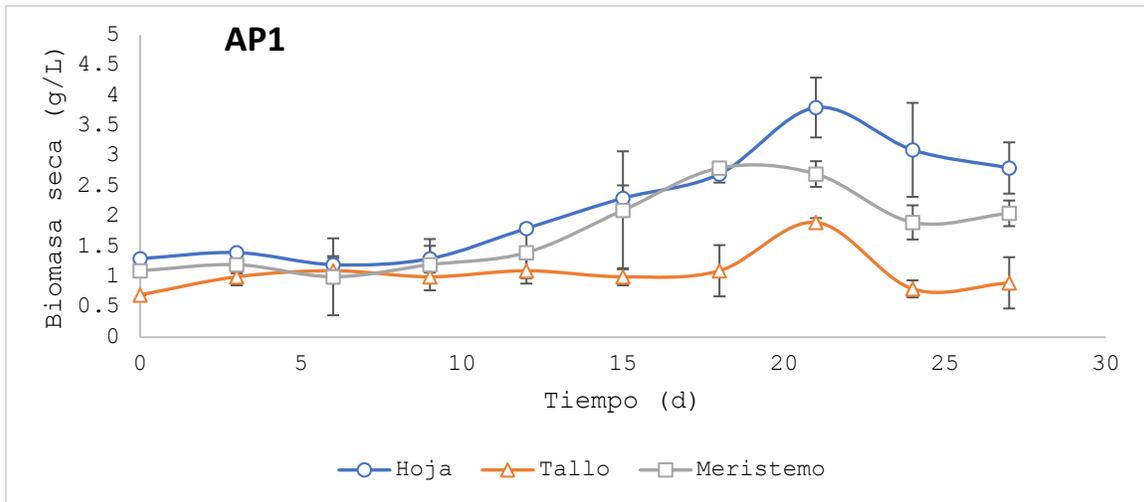


FIGURA 4.4 Perfiles cinéticos de producción de biomasa de líneas celulares de *Taxus globosa* AP1: hoja, tallo y meristemo.

Por otra parte, los cultivos AP2 presentan un comportamiento similar; cuentan con una fase de adaptación de 9 días que pueden llegar hasta los 18 días según el comportamiento de la línea celular de hoja de este tratamiento (Fig. 4.5).

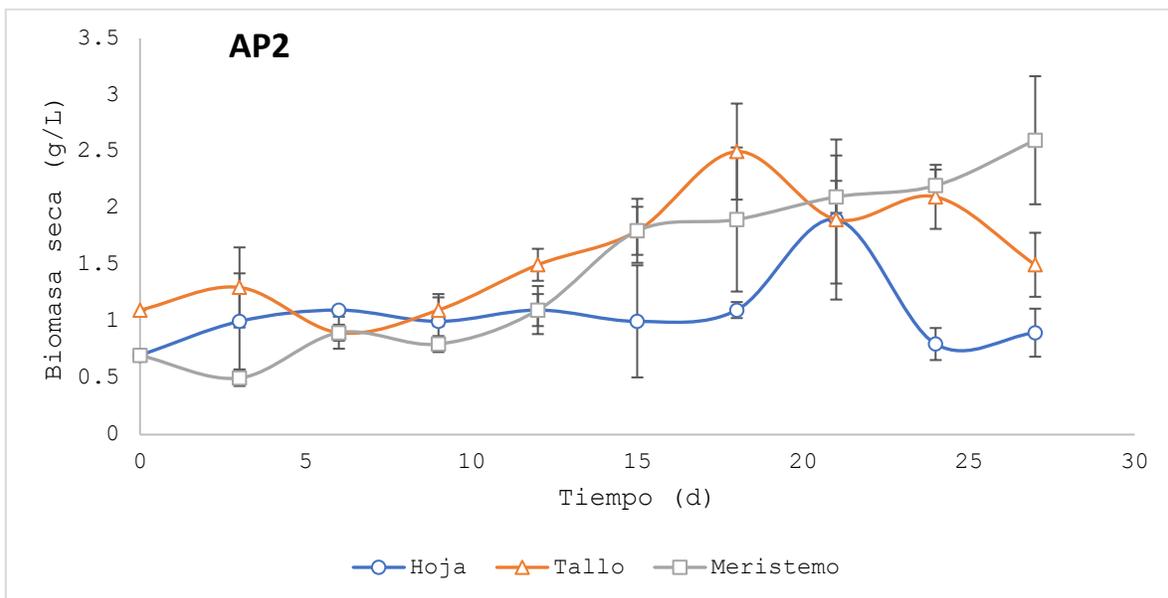


FIGURA 4.5 Perfiles cinéticos de producción de biomasa de líneas celulares de *Taxus globosa* AP1: hoja, tallo y meristemo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El periodo en el cual se alcanza la concentración de biomasa máxima en peso seco suele ser variable en estos cultivos (18 días-tallo, 21 días-hoja), particularmente la línea de meristemo presenta una tendencia lineal en la cual no pudo determinarse el periodo en el cual se alcanza la concentración máxima puesto que se alejaba del rango establecido para evaluar la cinética de crecimiento de cada una de las líneas celulares antes mencionadas, además, en lo referido al consumo de sustratos fue la única línea que presenta un consumo a partir del día 12 de incubación, esto podría mejorarse con el uso de elicitadores para promover la acumulación de taxanos.. Estos cultivos presentan un tiempo de duplicación de aproximadamente 6 d (Tabla 4.1); sin embargo, este comportamiento se ve opacado por la baja producción de biomasa y rendimiento específico ($Y_{P/X}$).

TABLA 4.1 Parámetros cinéticos de líneas celulares de *T. globosa* S.

	Línea celular	X_{max} (g/L)	μ_{max} (d ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (mg _P /g _X)	t_d (d)
AP1	Hoja	3.8	0.1128	8.747	6.144
	Tallo	2.6	0.1333	5.765	5.199
	Meristemo	3.8	0.1333	3.343	5.199
AP2	Hoja	1.9	0.1777	3.257	3.900
	Tallo	2.5	0.1904	0.313	3.640
	Meristemo	2.6	0.1085	1.519	6.388

Los estudios del comportamiento cinético de cada una de las líneas generadas (AP1 y AP2), muestran que la mejor línea para llevar a cabo los experimentos posteriores es la línea celular de hoja AP1, el cual presenta una producción de biomasa de 3.8 g BS/L, con un tiempo de duplicación de alrededor de los 6 días y un $Y_{P/X}$ de 8.747 mg de paclitaxel/g.

En este estudio se evaluó el consumo sacarosa disociados como glucosa y fructosa como fuentes de carbono teniendo como resultado valores negativos, se ha reportado que la concentración de sacarosa como fuente de sustrato es primordial para promover el crecimiento celular en los cultivos de esta especie (Tapia-Barrera, 2014).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 4.6, se muestra la concentración de sustratos, observados en un periodo de 27 días, en el que la concentración se encuentra cercana a los 15 g/L de glucosa y fructosa, es decir, 30 g/L de azúcares totales. Esto implica que no se registró un consumo significativo de sustrato del medio de cultivo.

Los perfiles de la concentración de sustrato sugieren que no hubo un consumo de sacarosa, por el contrario, se observan periodos en los que aumenta la concentración de sustrato con respecto a la medición inmediata anterior, esto puede deberse a que la pequeña variación en la concentración de azúcares es cercana a la magnitud del error experimental, concordando con lo reportado por Zavala, 2015.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

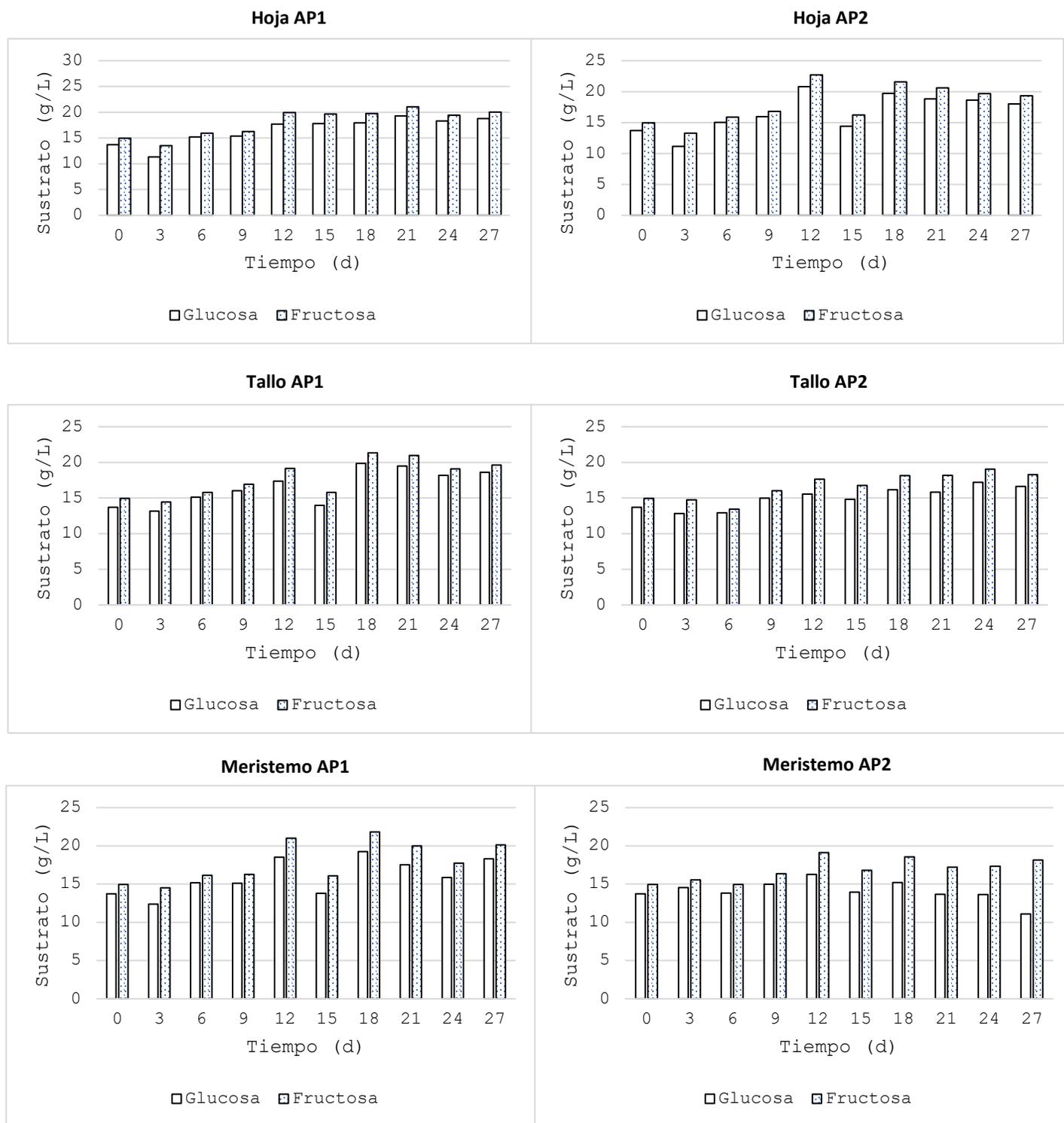


FIGURA 4.6 Perfiles de sustrato residual en líneas celulares (hoja, tallo y meristemo) de *Taxus globosa* sometidas a tratamientos AP1 y AP2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sacarosa es la fuente de carbono más utilizada y, de acuerdo con Saito y Miukami, (2002) se ha visto que un aumento en la concentración de glucosa incrementa la producción de metabolitos secundarios. Se pudiera atribuir esto al estrés osmótico o al exceso de sustrato que promueve el estrés necesario para la producción de metabolitos secundarios. Por otra parte, Zavala (2015), considera que es posible que no se consumiera una mayor cantidad de sustrato debido a alguna limitación celular y que estas limitaciones pueden deberse a la presencia de un sustrato limitante o mutaciones que dificulten el metabolismo de carbohidratos.

“En las células vegetales la deficiencia de boro tiene efectos adversos en el metabolismo de carbohidratos. Según Wilson, (1961) algunos de estos efectos pueden ser la acumulación de carbohidratos en vacuolas, así mismo puede ocurrir un alargamiento celular, adelgazamiento y malformaciones de la pared celular. Whittington, (1959) sostiene que es probable que las malformaciones en la pared celular sea un mecanismo que evita que las células entren en mitosis.”

También debe considerarse que las células de árboles leñosos suelen tener concentraciones de boro en el rango de 70-100 ppm, mientras que las yerbas tienen un rango menor de 2-5 ppm. Esto trae efectos en el metabolismo celular, puesto que la especie *Taxus globosa* es considerado como un árbol leñoso con exigencias en la concentración de boro, sin embargo, el medio Gamborg B5 empleado durante los experimentos contiene concentraciones de ácido bórico de 3 ppm; es posible que el cultivo estuviera limitado por boro, lo que explicaría parcialmente el nulo consumo de carbohidratos.

Otra consideración que debe tenerse es que, durante la técnica de separación del sobrenadante por centrifugación, las células pudieron sufrir rupturas lo que ocasionaba una liberación del contenido intracelular, esto incluye azúcares almacenados en las vacuolas los cuales fueron cuantificados de forma indistinta a los azúcares residuales del medio de cultivo.

Por lo anterior, los rendimientos de sustrato con respecto a la biomasa generada son negativos debido al perfil cinético que presentan los sustratos durante su estudio, el cual es similar los reportados por Tapia-Barrera, (2014) y Zavala, (2015).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2 Efecto del empleo de reguladores de crecimiento en la producción de paclitaxel y bacatina III.

Una vez realizada la inoculación de los cultivos celulares se procedió a la evaluación del efecto de los reguladores sobre el crecimiento de *Taxus globosa* S., lo cual permitió seleccionar la que presenta mejor respuesta de acuerdo a su crecimiento celular y producción de taxanos.

De acuerdo a la Tabla 4.2 los cultivos celulares sometidos al tratamiento AP1 presentan las mayores concentraciones de paclitaxel y bacatina III, siendo la línea de hoja la que posee mayores concentraciones comparadas con la de tallo y meristemo. Sin embargo, su comportamiento cinético muestra inestabilidad durante la producción de las mismas, esto puede deberse a error experimental.

TABLA 4.2 Producción máxima de taxanos de acuerdo al tratamiento al que fueron sometidos.

Tratamiento	Reguladores	Concentración (mg/L)	Línea celular	[P _{max}] (mg/L)	[B _{max}] (mg/L)
AP1	Cinetina	0.86	Hoja	13.121	4.887
	2,4-D	4.42	Tallo	7.3292	2.5445
	GA ₃	0.3	Meristemo	5.309	4.7892
AP2	ANA	2	Hoja	3.6034	1.9866
	BAP	0.5	Tallo	1.147	4.409
			Meristemo	2.6131	1.4447

*[P_{max}] y [B_{max}] representan las concentraciones máximas de paclitaxel y bacatina III, respectivamente.

La acumulación de los taxanos se midió mediante HPLC durante su periodo de crecimiento discontinuo. En particular, se cuantificaron paclitaxel y bacatina III. El comportamiento cinético de estos compuestos en los cultivos experimentales presenta las mayores concentraciones de bacatina III alrededor del día 9 mostrando una consecuente disminución con respecto al tiempo. Por otro lado, la concentración de paclitaxel aumenta con el tiempo

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

alcanzando hasta 5.36 mg/L alrededor de los 18 días. Esta tendencia es similar a la observada en los cultivos de *Taxus baccata* (Srinivasan *et al.*, 1995) y *Taxus cuspidata* (Naill y Roberts, 2005).

La línea celular de hoja sometida al tratamiento AP1 presenta la mayor concentración de paclitaxel (13.121 mg/L) a los 27 días de cultivo (Fig. 4.7). La acumulación de bacatina aparentemente muestra irregularidades, esto pudo deberse a pérdidas de la muestra durante la liofilización y filtración previo al análisis por HPLC; a pesar de esto, es claro que en periodos tempranos del cultivo la concentración de este precursor es mayor y a medida que transcurre el tiempo va disminuyendo para dar lugar a la producción de paclitaxel.

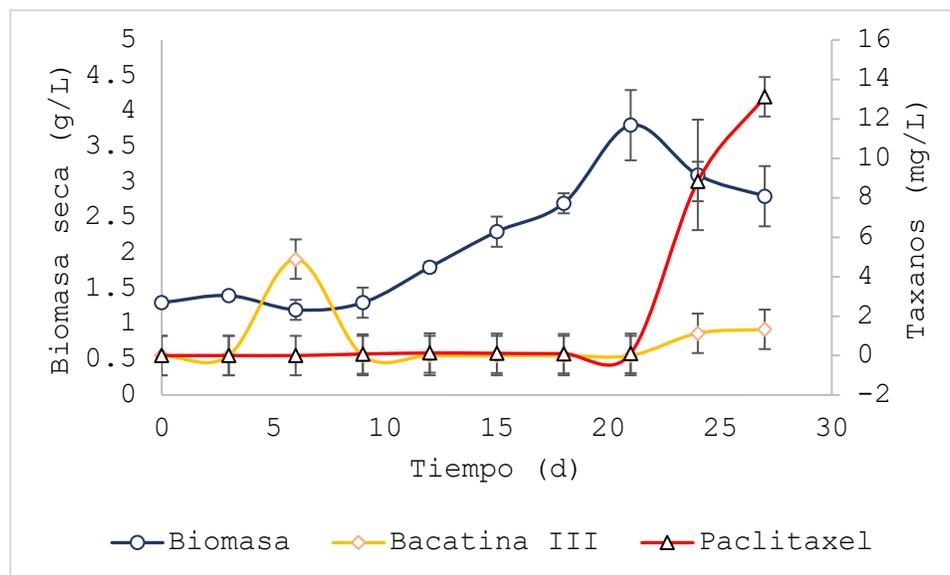


FIGURA 4.7 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos en la línea celular de hoja AP1.

Esta línea presentó una máxima producción de biomasa (3.8 g/L; 3 veces mayor al reportado por Alvarado-López, 2014 y Zavala, 2015), la acumulación de taxanos fue aproximadamente tres veces mayor a las otras líneas evaluadas con el mismo tratamiento alcanzando una concentración de 13.121 mg/L, la propagación de callos y su resistencia a la contaminación fue mayor comparadas con las líneas generadas en este trabajo y presenta viabilidad del 92%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otra parte, la línea celular de Tallo AP1 presentó la segunda concentración más alta de paclitaxel y la cuarta en la producción de bacatina III con 7.33 mg/L y 2.54 mg/L, respectivamente (Fig. 4.8). Esta línea celular presenta las concentraciones máximas de paclitaxel a los 6 días del cultivo y disminuye cuando se da lugar a la producción de paclitaxel al redor de los 18 días.

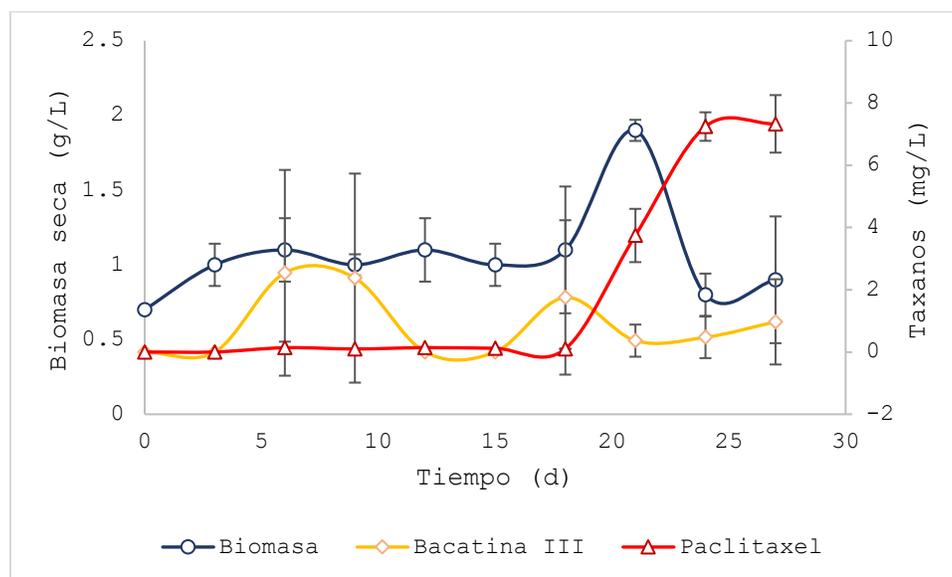


FIGURA 4.8 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos de la línea celular de tallo AP1.

La línea celular de meristemo AP1 (Fig. 4.9) muestra un marcado incremento en la producción de bacatina III durante los primeros días de cultivo celular y esta va disminuyendo con forme transcurre el tiempo, por el contrario, es a partir de los 18 días cuando se presentan las mayores concentraciones de paclitaxel (5.358 mg/L). Se puede observar que la producción de paclitaxel se encuentra relacionado directamente al crecimiento celular alcanzando una concentración máxima a los 24 días con una producción de 5.309 mg/L, al mismo tiempo se tiene la biomasa máxima de 3.8 g/L; ocurre lo contrario con la generación de bacatina III en el cultivo celular.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

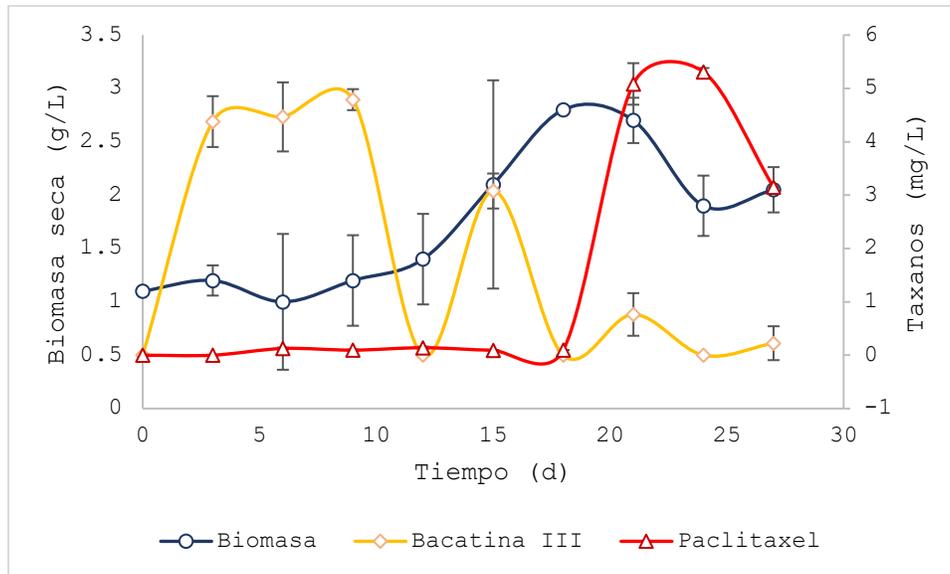


FIGURA 4.9 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos de la línea celular de meristemo AP1.

La caracterización cinética de las líneas celulares (hoja, tallo y meristemo) sometidas al tratamiento AP2 presentaron menores concentraciones de paclitaxel y bacatina III. La línea celular de Hoja AP2 presentó una producción de biomasa máxima de 1.9 g/L en base seca con un tiempo de duplicación de aproximadamente 4 días, esta línea celular presenta $Y_{P/X}$ de 3.25 g de paclitaxel por cada gramo de biomasa seca generada (Fig. 4.10).

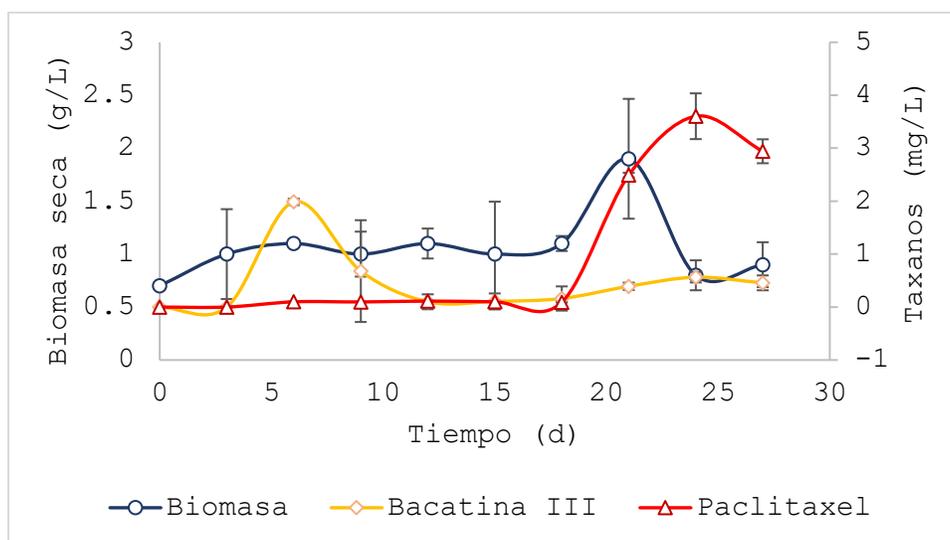


FIGURA 4.10 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos de la línea celular de hoja AP2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La línea celular de Hoja AP2 presenta un comportamiento cinético similar a las líneas sometidas al tratamiento AP1, presenta la concentración máxima de bacatina III (1.98 mg/L) a los 6 días de cultivo el cual disminuye con forme transcurre el periodo de cultivo. La concentración máxima de paclitaxel cuantificada en esta línea celular fue de 3.60 mg/L a los 24 días de cultivo. Sin embargo, a diferencia de las líneas anteriores la producción de biomasa en esta línea muestra variaciones durante su estudio cinético, esto podría deberse a que el cultivo se encontraba limitado a algún nutriente que promoviera su desarrollo, además, la influencia de los reguladores de crecimiento celular podría afectar al proceso de división celular.

Por otra parte, la línea celular de Tallo sometida al tratamiento AP2 fue la mejor productora de bacatina III en este tratamiento, con concentraciones máximas a los 3 días de cultivo de 4.41mg/L, sin embargo, las concentraciones máximas cuantificadas son por mucho menor a las líneas de meristemo y hoja en este tratamiento específicamente, puesto que se alcanzó 1.14 mg/L de paclitaxel a los 24 días de cultivo (Fig. 4.11). La línea celular de tallo AP2 presentó una producción de biomasa máxima de 2.5 g/L en base seca con un tiempo de duplicación de aproximadamente 4 días, esta línea celular presenta $Y_{P/X}$ de 0.313 g de paclitaxel por cada gramo de biomasa seca generada.

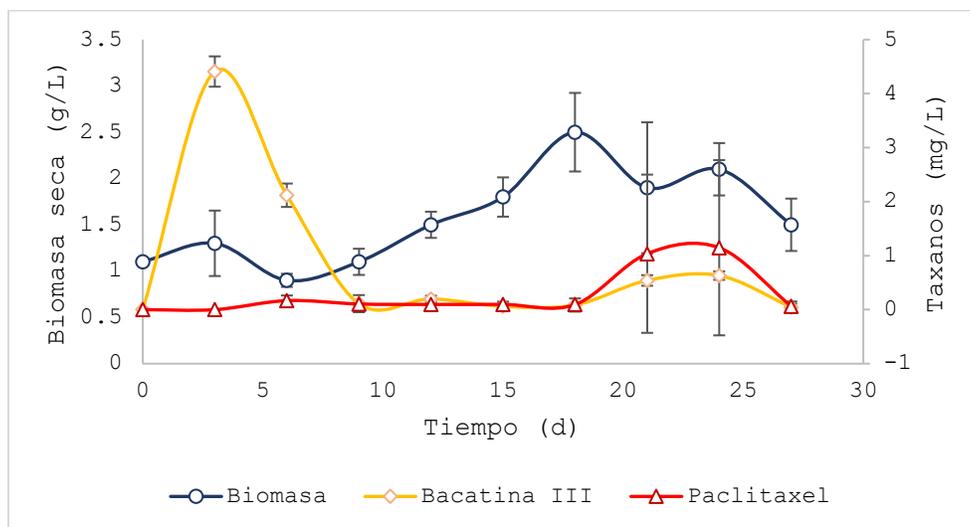


FIGURA 4.11 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos de la línea celular de tallo AP2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ocurre un caso similar con la línea celular de Meristemo AP2 (Fig. 4.12), esta línea presenta las mayores concentraciones de bacatina III y paclitaxel alrededor de los días 3 y 24, respectivamente. Sin embargo, las concentraciones de acumulación de estos taxanos fueron considerablemente inferiores a los obtenidos con la misma línea sometida al tratamiento AP1.

La línea celular de Meristemo AP2 ocupa el segundo lugar como mejor productora de paclitaxel entre las líneas sometidas al tratamiento AP2, alcanzando concentraciones de 2.61 mg/L de paclitaxel. Esta línea alcanzó una producción máxima de biomasa seca de 2.6 g/L a los 27 días de cultivo con tiempo de duplicación de alrededor de 6 días. Sin embargo, su rendimiento específico $Y_{P/X}$ fue de 1.51 (gramos de paclitaxel por cada gramo de biomasa seca)

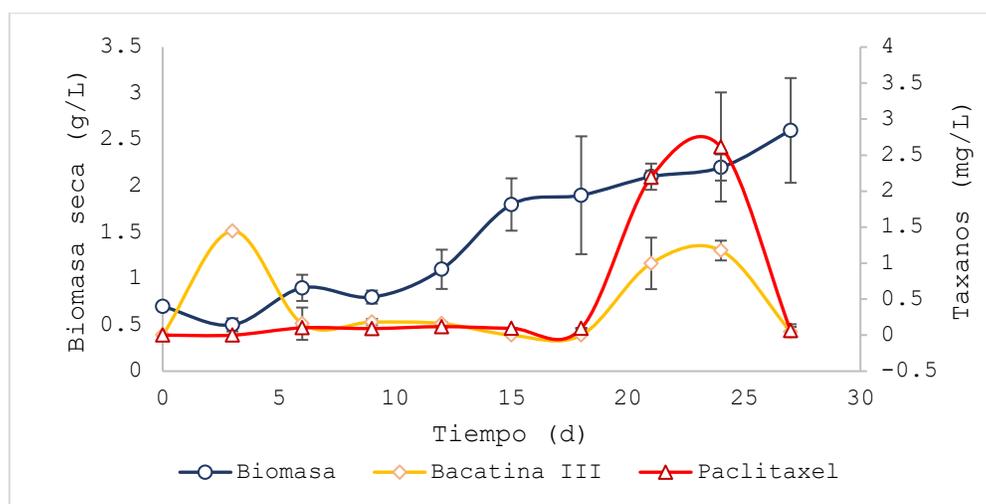


FIGURA 4.12 Perfiles cinéticos de producción de biomasa y taxanos de la línea celular de meristemo AP2.

Cabe señalar que el perfil de cada uno de los taxanos cuantificados en los tratamientos AP1 y AP2 de las líneas celulares aisladas (Fig. 4.13), son representativo de su ubicación en la ruta biosintética de taxanos puesto que se espera que los metabolitos precursores como la bacatina III alcancen un pico temprano y luego disminuyan a medida que el flujo de la ruta se dirija hacia la síntesis de paclitaxel, concordando con Naill y Roberts, (2005).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

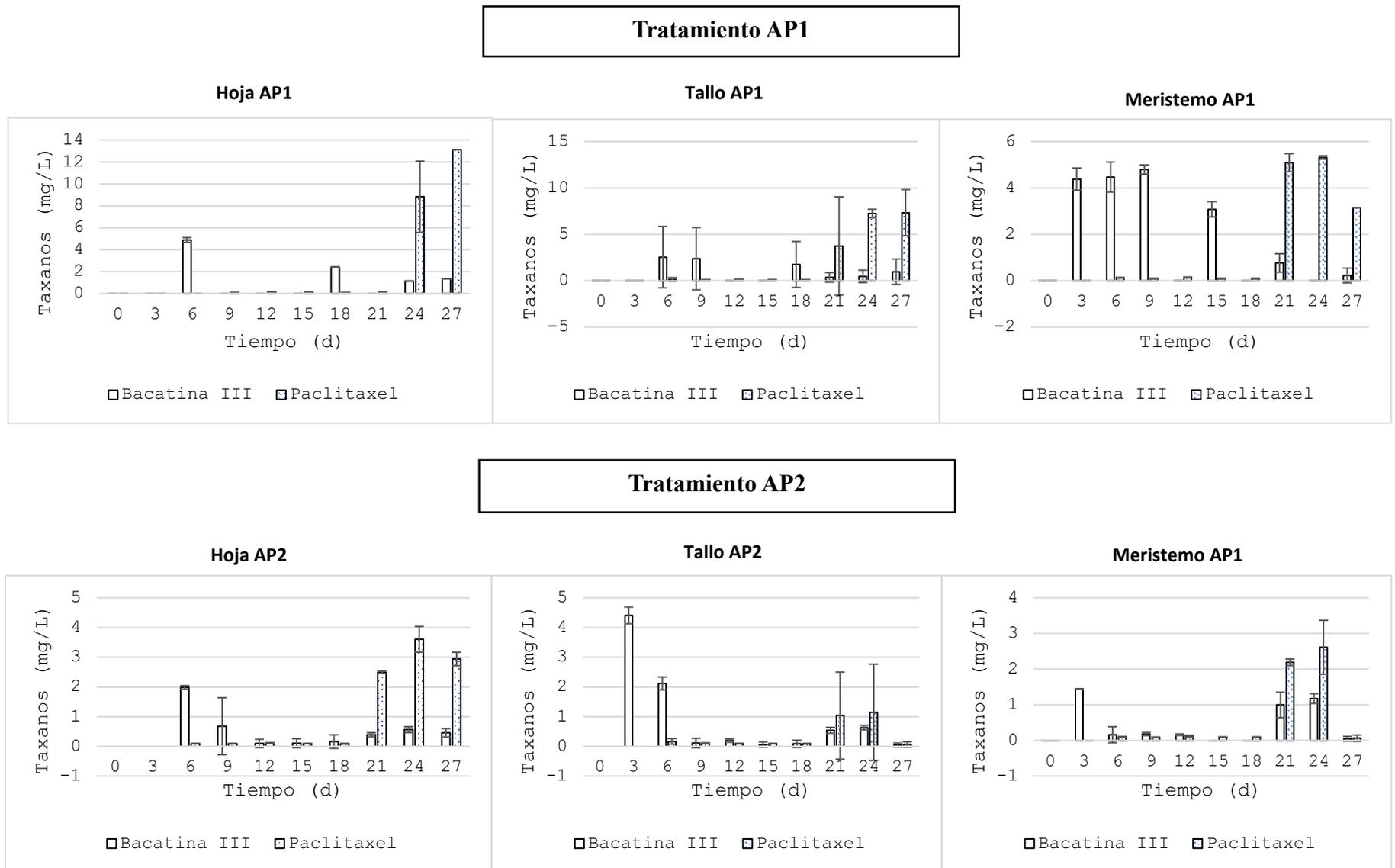


FIGURA 4.13 Comportamiento cinético de la producción de bacatina III y paclitaxel en líneas celulares (hoja, tallo y meristemo) de *Taxus globosa* sometidas al tratamiento AP1 y AP2

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento cinético de cada una de las líneas caracterizadas muestran las concentraciones máximas de bacatina III dentro de los primeros 9 días de cultivo y, es a partir de los 18 días cuando se comienza a cuantificar concentraciones de paclitaxel; en la Figura 15 se pueden observar barras de error con amplitud cuestionable, esto se debe a que la concentración máxima cuantificada fue de 13.121 mg/L de paclitaxel y 4.887 mg/L de bacatina III; mientras que la menor concentración fue de 0.09 mg/L de paclitaxel y 0.047 mg/L de bacatina lo que sugiere que un pequeño error experimental podría provocar la amplitud del rango de las variables de respuesta en el estudio, es decir, esto puede deberse a error experimental.

Los cultivos en suspensión mantuvieron su crecimiento con un porcentaje de viabilidad al rededor 85-90%, el cual fue variando de acuerdo a la línea y tratamiento probado. La línea celular de Hoja AP1 (Fig. 4.14), mantuvo su viabilidad variable, pero con un marcado incremento en la concentración celular (Cel/mL) hasta los 21 días a partir del cual disminuyó gradualmente.

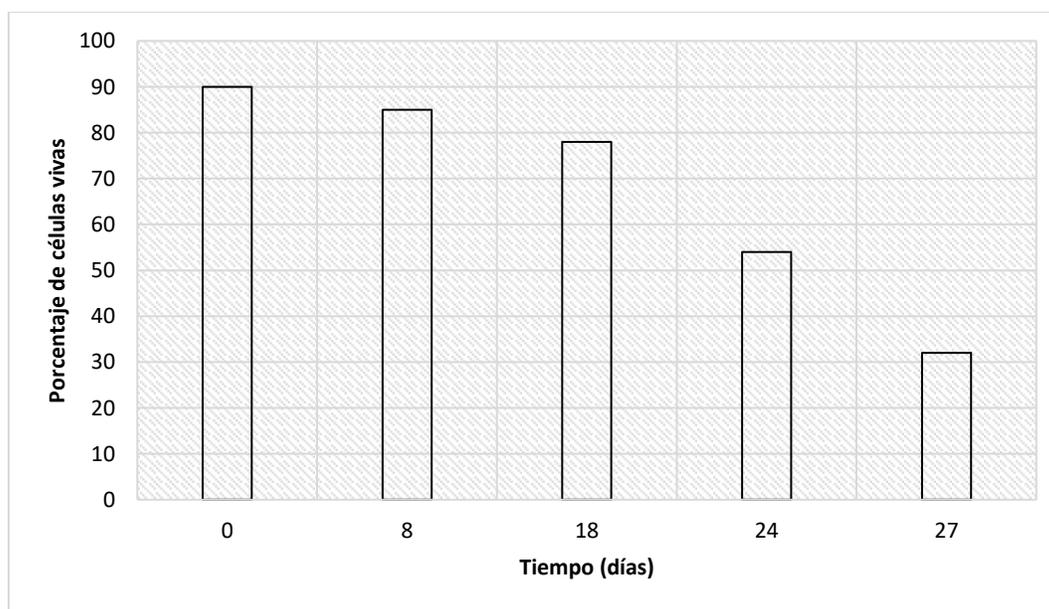


FIGURA 4.14 Viabilidad de los cultivos celulares de *Taxus globosa* en suspensión.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3 Desarrollo y establecimiento de la mejor línea celular productora de paclitaxel y bacatina III.

Los estudios de caracterización de los cultivos celulares mostraron que el mejor tratamiento utilizado es el AP1 puesto que las líneas aisladas y tratadas bajo estas condiciones tuvieron las mayores concentraciones de paclitaxel. Ahora bien, aun cuando el comportamiento sobre la producción de biomasa de las líneas celulares de meristemas concuerda con los reportados por Srinivasan *et al.*, (1995), y Naill y Roberts, (2005), la línea de hoja presentó la concentración máxima de paclitaxel (13.121 mg/L). La producción de biomasa en esta línea es inestable de acuerdo a los valores experimentales obtenidos, lo mismo sucede con la línea celular de tallo; por el contrario, la línea celular de meristemo mostró un marcado crecimiento celular.

En la figura 4.15 se puede observar el comportamiento de las líneas celulares de hojas sometidas al tratamiento AP1 y AP2, en la cual el tratamiento AP1 mostró un efecto positivo superior al obtenido con respecto al tratamiento AP2, a los 9 días de cultivo se observa un comportamiento exponencial en el crecimiento de biomasa, pudiéndose observar que la producción de paclitaxel se encuentra parcialmente asociado al crecimiento celular, puesto que es en la segunda etapa de cultivo cuando se logra cuantificar dicho metabolito.

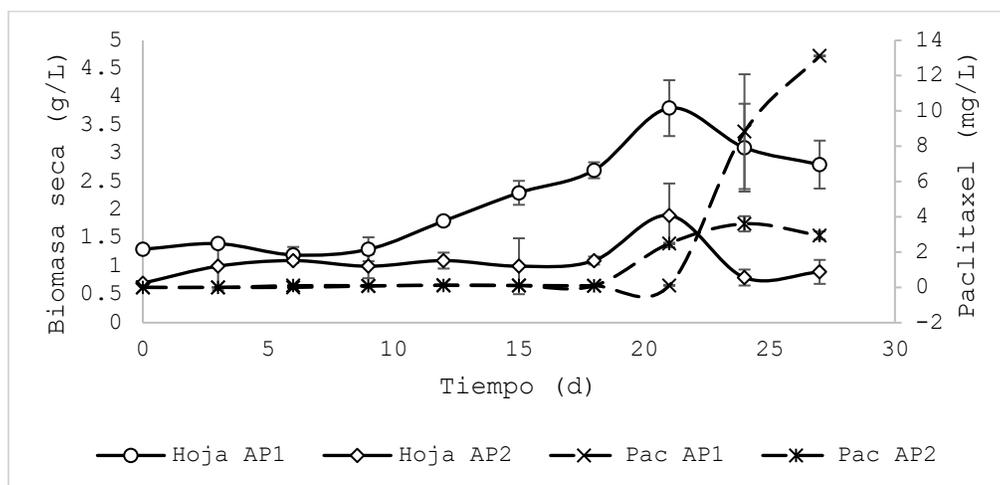


FIGURA 4.15 Producción de paclitaxel en líneas celulares de Hoja AP1 y AP2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a la caracterización cinética y estequiométrica realizada de cada una de las líneas celulares con los tratamientos AP1 y AP2, se desarrolló y estableció la línea celular de Hoja AP1 como la mejor productora de metabolitos secundarios de *Taxus globosa* en las variedades probadas.

Particularmente, en la línea de Hoja AP1 se muestran cambios morfológicos a nivel celular. Se puede observar que durante el establecimiento de la línea las células se encontraban agrupadas y mostraban una forma circular y compactas que no podían dividirse, durante los subcultivos posteriores los cuales permitieron establecer un cultivo celular finalmente disperso con alto ritmo de crecimiento, las células en esta etapa mostraron cambios en su estructura puesto que sufrieron un alargamiento (Fig. 4.16).

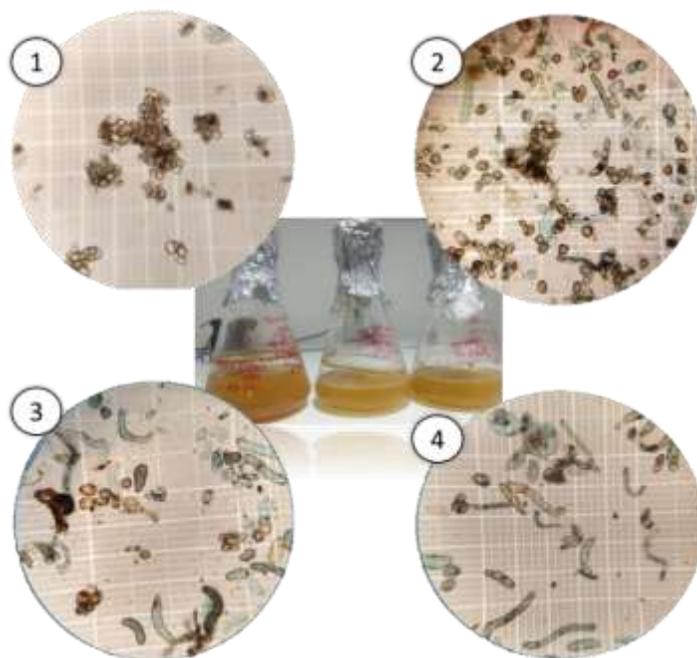


FIGURA 4.16 Vista a microscopio de la línea celular de hoja AP1 de *Taxus globosa*. (1) los primeros 10 días de cultivo, (2) periodo correspondido entre 12-24 días, (3-4) células poco viables a partir de los 27 días de cultivo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados concuerdan con los reportados por Benítez (2009) y Alvarado-López (2014), quienes asocian la forma celular alargada a las células productoras de paclitaxel. Sin embargo, a diferencia de la producción máxima inicial que presentan en sus cultivos, en este caso la producción máxima de metabolitos varía de acuerdo al tiempo en la cinética de crecimiento, es decir, a periodos tempranos se presenta las mayores concentraciones de bacatina III y a periodos largos se tiene la mayor concentración de paclitaxel.

Está claro que las líneas celulares tienen distinto comportamiento aun cuando éstas provienen del mismo árbol, de aquí la importancia del estudio fisiológico y celular de esta especie vegetal.

El consumo de sustrato en general en las líneas caracterizadas no es significativo (Fig. 4.17), estos resultados concuerdan con los reportados por Zavala-Ortiz, 2012. En el cual a partir de la segunda mitad de la cinética de crecimiento celular la concentración de glucosa aumentó significativamente. Sin embargo, aún no se ha elucidado el mecanismo biológico del incremento en la concentración de azúcares en el cultivo celular de *Taxus globosa*.

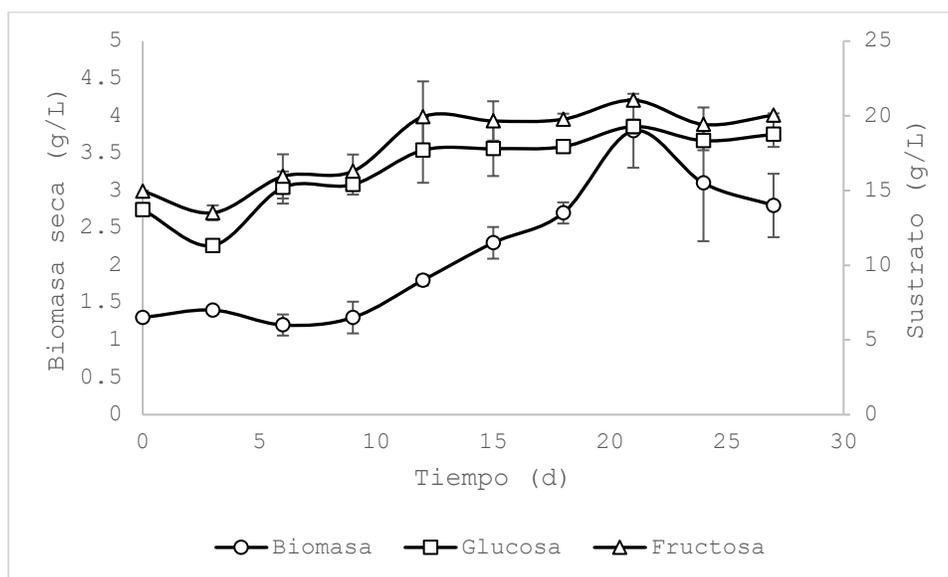


FIGURA 4.17 Comportamiento cinético de biomasa y sustrato residual (glucosa y sacaros) de la línea celular de hoja AP1 (*Taxus globosa*).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró establecer un cultivo celular de *Taxus globosa* con las mejores condiciones evaluadas, partiendo de 1.1 g de biomasa en base seca. Esta línea tuvo su pico de producción de 4.887 mg/L de bacatina III y 13.121 mg/L de paclitaxel a los 6 y 27 días, respectivamente (Fig. 4.18).

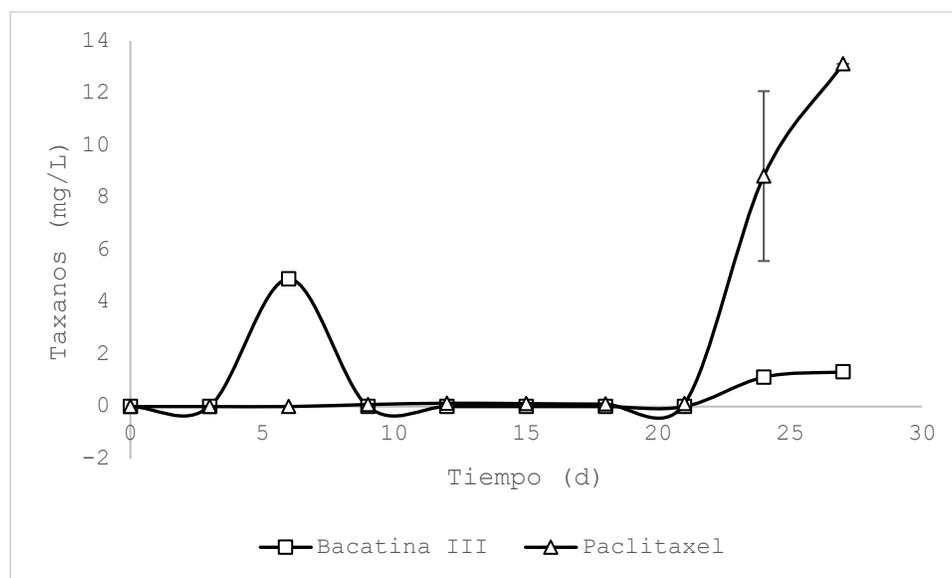


FIGURA 4.18 Producción de paclitaxel y bacatina III con respecto al tiempo en la línea celular de Hoja AP1 (*Taxus globosa*).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Naill y Roberts (2005), los cuales son representativo de su ubicación en la ruta biosintética de taxanos puesto que la bacatina siendo un precursor en la síntesis de paclitaxel presenta las concentraciones máximas a periodos tempranos del cultivo y luego disminuye a medida que el flujo de la ruta se dirige hacia la síntesis del paclitaxel.

Aun cuando se ha establecido la línea celular de hoja AP1 como la mejor productora debido a su comportamiento cinético, la línea celular de tallo AP1 mostró la segunda concentración máxima de paclitaxel (7.33 mg/L) y la tercera concentración máxima de bacatina III (2.54 mg/L) de las líneas sometidas a este tratamiento; por esta razón se recomienda la realización de estudios posteriores a las líneas establecidas en este trabajo. Finalmente se realiza una comparación nuestros resultados con los obtenidos por otros autores (Tabla 4.3).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 4.3 Estudios de *Taxus globosa* S. sobre la producción de antitumorales por cultivo *in vitro* de células vegetales.

Referencia	Condiciones	Medio de cultivo empleado	Biomasa (g/L)	Bacatina III (mg/L)	Paclitaxel (mg/L)
(Velázquez-Toledo, 2006)	Edad de cultivo: 10, 20 y 30 d [c]= 0.229 g/L (BH) T= 25°C pH= 5.6 Agitación= 110 rpm Oscuridad	Murashige & Skoog (MS) 1 mg/L 2,4-D 1 µM/L JM 20 g/L sacarosa	6.8 (BH)	6.45	N/R
(Barradas-Dermitz, 2010)	Edad de cultivo: 10, 20 y 30 d [c]= 0.229 g/L (BH) T= 25°C pH= 5.6 Agitación= 110 rpm Oscuridad	Murashige & Skoog (MS) 1 mg/L 2,4-D 1 µM/L JM 20 g/L sacarosa	6.8 (BH)	6.45	N/R
(Alvarado-López, 2014)	Edad de cultivo: 9 d [c]= 1.03 g/L (Bs) T= 24°C pH= 5.6 Agitación= 120 rpm Oscuridad	Gamborg B5 0.55 mg/L 2,4-D 10 µM/L JM 20 g/L sacarosa	0.1 (BS)	25.18	0.902
(Zavala-Ortíz, 2015)	Edad de cultivo: 6 d [c]= 8.8 g/L (BH) T= 25°C pH= 5.6-5.8 Agitación= 120 rpm Oscuridad	Gamborg B5 0.55 mg/L 2,4-D 10 µM/L JM 20 g/L sacarosa	2.2 (BS)	0.11	0.78
Este trabajo AP1	Edad de cultivo: 7 d [c]= 100 g/L (BH) T= 25°C pH= 5.7 Agitación= 120 rpm Oscuridad	Gamborg B5 4.42 mg/L 2,4-D 0.86 mg/L Kin 0.346 mg/L GA₃ 30 g/L sacarosa	3.8 (BS)	4.887	13.121
Este trabajo AP2	Edad de cultivo: 7 d [c]= 100 g/L (BH) T= 25°C pH= 5.7 Agitación= 120 rpm Oscuridad	Gamborg B5 2 mg/L ANA 0.05 mg/L BAP 30 g/L sacarosa	1.9 (BS)	1.9866	3.6034

Base seca (BS); base húmeda (BH); concentración celular ([c]); jasmonato de metilo (JM); Ác. 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); Cinetina (Kin); Ác. Giberélico (GA₃). Ác. α-naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Podemos observar que para los estudios realizados en la especie *Taxus globosa* se han empleado condiciones similares durante los estudios cinéticos, esto es en condiciones de obscuridad a 25°C y de 110-120 rpm. Se destaca que aquellos trabajos en los que la concentración de inóculo es baja, la producción de los metabolitos secundarios se ve limitada con concentraciones de bacatina III de 25.18 mg/L y 0.902 mg/L de paclitaxel reportado por Alvarado-López, (2014); así mismo, Zavala-Ortíz, (2015) reporta concentraciones de bacatina III de 0.11 mg/L y 0.78 mg/L de paclitaxel.

Se demostró que el empleo de la combinación de los reguladores de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (Kin) y ácido giberélico (GA3) tuvo mayor respuesta en la producción de paclitaxel alcanzando una concentración máxima de 13.121 mg/L y 4.887 mg/L de bacatina III en la línea celular de hoja.

El establecimiento de las líneas celulares con el empleo de los reguladores ácido α -naftalenacético (ANA) y 6-benzilaminopurina (BAP) fue exitoso; sin embargo, sus concentraciones máximas fueron de 1.9866 mg/L de bacatina III y 3.6034 mg/L de paclitaxel en la línea de hoja.

Se pudo observar que al incrementar el tamaño de inóculo las concentraciones de los metabolitos aumentaban considerablemente. Cabe señalar, que en este estudio no se empleó elicitadores los cuales han demostrado promover la excreción de estos metabolitos en las especies de *Taxus* tratadas.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

En México se cuenta con la especie *Taxus globosa* S., una de las especies del género *Taxus* con mayores acumulaciones de taxanos. Se logró generar líneas celulares de *Taxus globosa* S., de dos regiones montañosas del estado de Veracruz, México. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar mayor contenido de taxanos en hojas que, en tallo y meristemo, en las variedades probadas.

En este trabajo se logró obtener una concentración de bacatina III y paclitaxel variable (1.13-4.92 mg/L y 2.07-13.121 mg/L, respectivamente), dependiendo del tipo de explante que se utilice. Lo cual comprobó la capacidad de acumulación de taxanos en esta especie poco estudiada.

Los tratamientos empleados para la inducción y generación de los cultivos celulares en suspensión fueron exitosos. El mejor tratamiento empleado fue el AP1 el cual contenía nutrientes Gamborg B5 suplementado con 30 g/L de sacarosa, 2,4-D (4.42 mg/L), Kin (0.86 mg/L), GA3 (0.346 mg/L).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.2 RECOMENDACIONES

Los cultivos celulares en suspensión de especies vegetales como *Taxus globosa* S., representan un reto para la biotecnología dedicada a la identificación, cuantificación y finalmente el escalamiento de la producción de metabolitos secundarios de importancia farmacéutica. Las líneas celulares de los tejidos vegetales son generalmente inestables por largos periodos de producción de taxanos por lo que es necesario la evaluación de su estabilidad durante esta etapa.

Los estudios realizados en este trabajo no incluyen el empleo de elicitadores, lo cual se ha demostrado su efectividad promoviendo la excreción del paclitaxel en cultivos celulares del género *Taxus* en los que ha sido probado. Por esta razón, es necesario evaluar el efecto de elicitadores en las líneas establecidas como productoras de este metabolito secundario.

La concentración de taxanos varía de acuerdo al origen del explante, a la línea celular, la edad y las condiciones del cultivo; por esta razón, se recomienda la realización de estudios posteriores que permitan mayores rendimientos del bioactivo de interés en los cultivos en suspensión para conocer su respuesta biosintética en cultivo *in vitro* bajo condiciones controladas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer IARC. (2014). *Cáncer en cifras*. Recuperado el 22 de Octubre de 2018, de <http://www.infocancer.org.mx/resumen-con780i0.html>
- Alvarado-López, M. (2014). Producción de paclitaxel y bacatina III con líneas celulares de *Taxus globosa* S., tejo mexicano. *Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica*.
- American Cancer Society ACS. (2016). *Aspectos básicos sobre el cáncer*. Recuperado el 07 de Octubre de 2018, de <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
- Área de Información y Documentación Ambiental. (2015). *Catálogo Regional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, y de Árboles Singulares*. Madrid: Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., & Retrepo, J. (2009). Engineering aspects of the in vitro plant cell culture for the production of secondary metabolites. *DYNA Revista de la Facultad de Minas Colombia*, 76(157), 109-121.
- Barradas-Dermitz, D., Hayward-Jones, P., Mata-Rosas, P., Palmero-Sánchez, B., Platas-Barradas, O., & Velásquez-Toledo, R. (2010). *Taxus globosa* S. cell lines: initiation, selection and characterization in terms of growth, and Bacatin III and Paclitaxel production. *Biocell*, 34(1), 1-6.
- Barrales, C. H., & Ramírez, S. M. (2013). A review on the production of taxoids anti-cancer of callus and cells of *Taxus* spp. in cultures in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 167-177.
- Barrales, C. H., & Soto, H. M. (2011). Bioquímica de los taxoides utilizados contra el cáncer. *Revista de Educación Bioquímica*, 30(1), 12-20.
- Barrales-Cureño, H. J., & Soto-Hernández, R. M. (2012). Taxoides: Metabolitos Secundarios del Árbol del Tejo (*Taxus* spp.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18(2), 207-218.
- Barrales-Cureño, H. J., Farrera, R. A., Reyes, R. C., Hernández, F. I., García, A. E., & Chávez, S. S. (2016). Taxol generalities: a systematic review. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 16(1), 75-91.
- Benítez, G. (2009). Análisis del contenido de taxol y otros taxanos y su relación con la expresión del gen ts en cultivos in vitro de *Taxus globosa* Schltld. *Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos-IPN*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science*, 161(1), 839-851.
- Calva, C. G., & Pérez, V. J. (2005). Cultivo de Células y Tejidos Vegetales: Fuentes de Alimento para el Futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 3-16.
- Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. (2012). Paclitaxel. *Revista Cubana de Farmacia*, 46(4), 470-472.
- Coleman, N. C. (2008). *¿Qué hacer con un diagnóstico de cáncer?* México: Editorial Pax México.
- Contreras-Medina, R., Luna-Vega, I., & Ríos-Muñoz, C. A. (2010). Distribution of *Taxus globosa* (Taxaceae) in Mexico: Ecological niche modeling, effects of land use change and conservation. *Revista Chilena de Historia Natural*, 83(1), 421-433.
- Croteau, R., Ketchum, R., Long, R., Kaspera, R., & Wildung, M. (2006). Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews*, 5(1), 75-97.
- Cusidó, R., Palazón, J., Bonfill, M., Navia-Osorio, A., Morales, C., & Piñol, T. (2002). Improved Paclitaxel and Baccatin III Production in Suspension Cultures of *Taxus media*. *Biotechnology Progress*, 18(1), 418-423.
- DrugBank. (2018). *Paclitaxel*. Recuperado el 13 de Noviembre de 2018, de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01229>
- Eisenreich, W., Menhard, B., Hylands, P., Zenk, M., & Bacher, A. (1996). Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not mevalonoid origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93(13), 6431-6436.
- Engels, B., Dahm, P., & Jennewein, S. (2008). Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metabolic Engineering*, 10(1), 201-206.
- Fernández, C., López, D., Alonso, N., Toribio, M., & Alegre, J. (2004). Conservación y caracterización de poblaciones de tejo. *Agricultura Revista Agropecuaria*, 950-957.
- Fett-Neto, A., Zhang, W., & DiCosmo, F. (1994). Kinetics of Taxol Production, Growth, and Nutrient Uptake in Cell Suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 44((1)), 205-210.
- Flores-Bustamante, Z. R., Rivera-Orduña, F. N., Martínez-Cárdens, A., & Flores-Cotera, L. B. (2010). Microbial paclitaxel: advances and perspectives. *The Journal of Antibiotics*, 60, 460-467.
- Gaff, D., & Okong'o-Ogola, O. (1971). The Use of Non-permeating Pigments for Testing the Survival of Cells. *Journal of Experimental Botany*, 22(3), 756-758.
- George, E., Hall, M., & De klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (Tercera ed.). Dordrecht, Holanda: Springer.

6. BIBLIOGRAFÍA

- González, O., Fernández, A., Fraga, Y., Pino, B., Hernández, M. M., & Silva, J. (2007). Evaluación de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD en plantas de *Ipomoea batatas*. *Cultivos tropicales*, 28(2), 39-43.
- Guerrero, R. (1997). *Tesis de Licenciatura en Biología-UNAM: Aislamiento y elucidación estructural de un peracetiltaxano y otros constituyentes del tejo mexicano Taxus globosa Schledl (Taxaceae)*. México.
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R., & Fischer, R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1415-1422.
- Índice Internacional de Nombres de Plantas IPNI. (23 de Abril de 2015). *El índice internacional de nombres de plantas*. Obtenido de <http://www.ipni.org/index.html>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. (2017). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)*. Aguascalientes, Ags. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. (2018). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)*. Recuperado el 23 de Octubre de 2018, de http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf
- International Agency for Research on Cancer IARC. (2018). *Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018*. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2018/pdfs/pr263_E.pdf
- Jennewein, S., Wildung, M., Chau, M., Walker, K., & Croteau, R. (2004). Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101(24), 9149-9154.
- Kieran, P., MacLoughlin, P., & Malone, D. (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59(1), 39-52.
- Laza, L. D., Rodríguez, L. I., & Sardiña, C. G. (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(3).
- Long, R., & Croteau, R. (2005). Preliminary assessment of the C13-side chain 2'-hydroxylase involved in Taxol biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477(2), 410-417.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Long, R., Lagiseti, C., Coates, R., & Croteau, R. (2008). Specificity of the N-benzoyl transferase responsible for the last step of Taxol biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 477(2), 384-389.
- López-Herrera, M. (2008). *Taxus globosa* S. Una especie medicinal en el parque nacional El Chico, Hidalgo. (Primera Edición ed.). Pachuca, Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M., & Portolés, A. (2009). Velázquez. *Farmacología básica y clínica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana, S. A.
- Martínez, A. J., & García, G. M. (2012). *Promoción de la Salud*. España: Ediciones Paraninfo.
- Mendoza, P. N. (2008). *Farmacología médica*. México: Editorial Médica Panamericana, S. A. de C. V.
- Naill, M., & Roberts, S. (2005). Cell cycle analysis of *Taxus* suspension cultures at the single cell level as an indicator of culture heterogeneity. *Wiley InterScience*, 491-500. doi:10.1002/bit.20446
- National Cancer Institute NCI. (2017). *Tratamiento del cáncer*. Recuperado el 23 de Octubre de 2018, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- Nicolaou, K., Yang, Z., Liu, J., Ueno, H., Nantermet, P., Guy, R., . . . Sorensen, E. (1994). Total Synthesis of Taxol. *National Center for Biotechnology Information*, 367(1), 630-634.
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2014). *Cáncer*. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de <https://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2018). *Cáncer: datos y cifras*. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2018). *Cáncer: Datos y cifras*. Recuperado el 07 de Octubre de 2018, de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Organización Panamericana de la Salud OPS. (2014). *El cáncer en la región de las Américas*. Recuperado el 20 de Octubre de 2018, de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/OPS-Nota-Informativa-Cancer-2014.pdf>
- Osuna, L., Tapia, N., Cusido, R., Palazón, J., Bonfill, M., Zamilpa, A., Cruz-Sosa, F. (2015). Taxane production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cell cultures of Mexican yew (*Taxus globosa* Schltdl). *Acta Physiol Plant*, 37(1).
- Ramachandra, S., & Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ramírez-Estrada, K. (2015). Cultivos celulares de *Taxus* spp., una eficaz herramienta biotecnológica para la producción de taxanos y el desarrollo de estudios básicos sobre su biosíntesis. *Tesis Doctoral en Biotecnología*.
- Ramírez-Sánchez, S. E., López-Upton, J., García de los Santos, G., Vergas-Hernández, J., Hernández-Livera, A., & Ayala-Garay, Ó. (2011). Variación morfológica de semillas de *Taxus globosa* Schltld. provenientes de dos regiones geográficas de México. *Revista Fototécnica Mexicana*, 2, 93-99.
- Ramkrishna, S., & Swaminathan, T. (2004). Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochemical Engineering Journal*, 21(1), 141-148.
- Raskin, I., Ribnicky, D., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., . . . Fridlender, B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *TRENDS in Biotechnology*, 20(12), 522-531.
- Sajc, L., Grubisic, D., & Vunjak-Novakovic, G. (2000). Biorreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*, 4(2), 89-99.
- Sánchez, P. L. (2012). *Caracterización del hábitat de Taxus globosa Schltld. (Taxaceae) (Tesis de pregrado)*. Xalapa, Veracruz, México. Recuperado el 17 de Noviembre de 2018
- Schlatmann, J., Hoopen, H., & Heijnen, J. (1996). *Large-scale production of secondary metabolites by plant cell cultures*. New Cork: CRS Press.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT. (2002). *Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Diario Oficial, 2da Sección. Protección ambiental -Especies nativas de México de flora y fauna silvestres -Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especie en riesgo*. México, D. F. Recuperado el 17 de Noviembre de 2018
- Secretaría de Salud. (2005). *Catálogo de Medicamentos Genéricos para Farmacias y Público en General*. Recuperado el 16 de Noviembre de 2018, de http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/137.HTM
- 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* SCHLTDL. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 72(1), 119-127.
- Song, J., Kanazawa, I., Sun, K., Murata, T., & Yokoyama, K. (1999). Color Coding the Cell Death Status of Plant Suspension Cells. *BioTechniques*, 26, 1060-1062.
- Sricastava, A., & Praskash, G. (2006). Modeling of azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. *Biochemical Engineering Journal*, 29(1), 62-68.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Srinivasan, V., Petschenker, L., Moser, S., Hirasuna, T., Taticcek, R., & Shuler, M. (1995). Taxol production in bioreactors: kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake, and taxol production by cell suspension of *Taxus baccata*. *Biotechnol Bioeng.*, *47*, 666-676.
- Tapia, B. N. (2014). *Producción de taxol y taxanos relacionados en cultivos de células en suspensión de Taxus globosa (Schltdl)*. Tesis Doctoral en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana. Recuperado el 18 de Noviembre de 2018
- Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. (2005). Cultivo de células vegetales: la célula vegetal es totipotente. *Revista Digital Universitaria*, *6*(11).
- Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). (2014). *Cátedra de fisiología vegetal: crecimiento y desarrollo*. Argentina: Azul Courtis.
- Van Rozendaal, E. L., Lelyveld, G. P., & Van Beek, T. A. (2000). Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related taxoids. *Phytochemistry*, *53*(1), 383-389.
- Velásquez-Toledo, R. (2006). *Tesis de Maestría: Estudios básicos sobre la producción de paclitaxel y baccatina III a partir de líneas celulares de Taxus globosa S.* Universidad Veracruzana, Veracruz, Ver., México.
- Walker, K., & Croteau, R. (2000a). Taxol biosynthesis: Molecular cloning of a benzoyl-CoA: taxane 2 α -O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *97*(25), 13591-13596.
- Walker, K., & Croteau, R. (2000b). Molecular cloning of a 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *97*(2), 583-587.
- Walker, K., Fujisaki, S., Long, R., & Croteau, R. (2002). Molecular cloning and hereologous expression of the C13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *99*(20), 12715-12720.
- Wall, M. E., & Wani, M. C. (1996). Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*, *51*(1), 239-254.
- Wang, H.-Q., Zhong, J.-J., & Yu, J.-T. (1997). Enhanced production of Taxol in suspension cultures of *Taxus chinensis* by controlling inoculum size. *Biotechnology Letters*, *19*(4), 353-355.
- Wheeler, N. C., Jech, K., & Masters, S. (1992). Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. *Journal of Natural Products*, *55*(4), 432-440.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Wickremesinhe, E., & Arteca, R. (1993). *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35(1), 181-193.
- Witherup, K. M., Look, S. A., Stasko, M. W., Ghiorzi, T. J., & Muschik, G. M. (1990). *Taxus* spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation. *Journal of Natural Products*, 53(5), 1249-1255.
- Zavala-Chávez, F., Soto-Hernández, M., & Rodríguez-González, M. T. (2001). El Romerillo (*Taxus globosa* Schlecht.): Biología, Dificultades Y Uso. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 7(1), 77-94.
- Zavala-Ortiz, D. (2012). *Proyecto de Bioingeniería: Diseño de una planta piloto para estudios en la producción de taxoides en cultivo in vitro de Taxus globosa S. (Linea celular 3)*. Veracruz, Ver., México.
- Zhang, C., Wu, J., & He, G. (2002). Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(1), 396-402.
- Zhang, W., Franco, C., Curtin, C., & Conn, S. (2004). To Stretch the Boundary of Secondary Metabolite Production in Plant Cell-Based Bioprocessing: Anthocyanin as a Case Study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 264-271.

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS Y NO PLAGIO

En la Ciudad de Veracruz, Veracruz a los 26 días del mes de noviembre de 2020. El que suscribe el **IBQ. Manuel Adrián Martínez Ancheyta** por mi propio derecho y en calidad de autor de la tesis titulada: **"Obtención de líneas celulares de *Taxus globosa* S. tejo mexicano para la producción de paclitaxel y baccatina III"** (en lo sucesivo la "TESIS") manifiesto que cedo a título gratuito la totalidad de los derechos patrimoniales de autor que sobre ella me corresponden, a favor del Tecnológico Nacional de México (en lo sucesivo el "TecNM"). Lo anterior en términos de los antecedentes y consideraciones siguientes:

- I. Que la presente cesión de derechos de la "TESIS" se transfiere en virtud de lo estipulado en los establecido en los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, sin reservarme acción legal de ningún tipo.
- II. Manifiesto bajo protesta de decir verdad, que la "TESIS" es original, inédita y propia, no existiendo impedimento de ninguna naturaleza para la cesión de derechos que se está haciendo, respondiendo además por cualquier acción de reivindicación, plagio u otra clase de reclamación que al respecto pudiera sobrevenir.
- III. Que la titularidad de derechos de autor de la "TESIS" en términos del artículo 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor (reproducción, en todas sus modalidades, transformación o adaptación, comunicación pública, distribución y en general cualquier tipo de explotación que de la "TESIS" se pueda realizar por cualquier medio conocido o por conocer, son propiedad única y exclusiva del "TecNM", adquiriendo el derecho de reproducción en todas sus modalidades, el derecho de transformación o adaptación, comunicación pública, distribución y en general cualquier tipo de uso que de la "TESIS" se pueda realizar por cualquier medio conocido o por conocer. La cesión de derechos se realiza con carácter permanente e irrevocable.
- IV. El TecNM podrá exhibir la "TESIS" a través de cualquier medio, en cualquier parte del mundo, incluso ser modificada, comprendida, traducida y de cualquier forma explotada en su totalidad o parcialidad.
- V. Que no he otorgado, ni otorgaré por ningún motivo, consentimiento alguno para la utilización de la "TESIS" por cualquier medio y su materialización en productos o servicios de cualquier naturaleza, a favor de ninguna persona física o moral, distinta a el "TecNM".
- VI. Estoy enterado del contenido y alcance legal de la presente cesión de derechos, firmando al final del presente documento para su certificación.

Señalo como correo electrónico para recibir futuras notificaciones: **ibq_ancheyta@hotmail.com**



EL AUTOR