

ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de ingreso como Académico Correspondiente

APORTACIONES DE LA FISIOLÓGÍA VEGETAL A LA FARMACIA
ILMO. SR. DR. RICARDO SÁNCHEZ ZAMÉS

Presentación a cargo del Académico Numerario
Dr. Francisco Díaz-Fierros Viqueira

Santiago de Compostela
Julio de 2007

ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

PRESENTACIÓN A CARGO DEL ACADÉMICO
NUMERARIO
DR. FRANCISCO DÍAZ-FIERROS VIQUEIRA

Julio de 2007

Excelentísimos e ilustrísimos señores académicos

Señoras y señores:

Ricardo Sánchez Tamés, siguiendo la estela de otros farmacéuticos asturianos ilustres como Fernando Suárez, Antolín Rodríguez Ponga o Fernando Carrera, eligió la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela como la institución en la que debería realizar los estudios que lo capacitarían para el ejercicio de esta centenaria profesión.

Llega a Santiago en el año 1959 procedente de su tierra natal de Llanes, seis años después se licencia y, prácticamente sin intervalo, inicia sus tareas como profesor adjunto interino en la cátedra de Fisiología Vegetal bajo la dirección del profesor D. Ernesto Vieitez Cortizo. Se especializa en el estudio de reguladores de crecimiento en el Leed Research de Oxford y en el Bedford College de Londres y, en ese campo, realiza sus primeras publicaciones científicas. En 1973 es nombrado Profesor Adjunto Numerario y, en el mismo año, obtiene la plaza de Profesor Agregado de Fisiología Vegetal de la Universidad de Oviedo, donde poco después accede a la plaza de catedrático de la misma asignatura. Y será en esta universidad donde Sánchez Tamés desarrolle ya toda su actividad profesional creando y dirigiendo un amplio y sólido grupo de investigación en la Facultad de Biología.

Sus trabajos científicos en el campo de la Fisiología Vegetal abarcan temas tan diversos como el enraizamiento con reguladores de crecimiento vegetal, los estudios de química y bioquímica vegetal, fundamentalmente los relacionados con los factores de control de determinados enzimas, la acción de los herbicidas como el glifosato, las técnicas de cultivo *in vitro* y, en general, los problemas del metabolismo vegetal. Y, como no podía ser menos, en un asturiano practicante y convencido como Tamés, muchos de estos trabajos fueron dedicados a especies vegetales que tenían un indudable interés para la economía del Principado como la manzana de sidra, el avellano, el castaño o el eucalipto, así como otros de prometedor futuro comercial como el kiwi o los helechos ornamentales. De sus últimos trabajos serían de destacar los estudios sobre las relaciones sobre el control ambiental de cultivos *in vitro* y, en general, con todo lo relativo a la biotecnología vegetal de especies leñosas. Tiene más de un centenar de publicaciones, la mayoría en revistas de difusión internacional, y otras tantas comunicaciones a congresos, siendo de destacar los libros que codirigió en 1988 sobre *Metabolismo y modo de acción de las fitohormonas*, publicado por la Universidad de Oviedo y el editado en 1990 por la editorial Plenum de Nueva York sobre *Plant Aging. Basic and Applied Approaches*. Dirigió 14 tesis doctorales y numerosos trabajos de licenciatura.

Pero si son importantes e indiscutibles sus aportaciones en campos de especialización tan señalados de la Fisiología Vegetal, no lo son menos, sus contribuciones a la didáctica y al

estudio de la problemática universitaria, de las que destacaría, sin duda, el libro de texto que con otros profesores españoles publicó en 1980 sobre *Fisiología Vegetal*, del que van realizadas ya siete ediciones y tres reimpresiones. Así mismo, su libro *Como publicar*, del año 2000, que ya está en su segunda edición, así como otras contribuciones en campos como la historia de la ciencia, demuestran que su visión de la profesión universitaria no se circunscribe al estrecho mundo de la especialización científica, *saber cada vez más de cada vez menos*, sino que se abre y se proyecta en sus conocimientos sobre toda la sociedad. Y como Ricardo Sánchez Tamés no es hombre que se quede en las meras palabras desarrolló también una fecunda labor docente y de política universitaria desempeñando, en la Universidad de Oviedo, puestos directivos de Director de Departamento, Decano de la Facultad de Biología y Vicerrector de Investigación y, en la actualidad, de Defensor del Estudiante donde su cercana y extrovertida personalidad está dejando, no me cabe la menor duda, una marca indiscutible y perdurable.

Amigo Ricardo, van cumprirse xa casi cincuenta anos da tua chegada a esta cidade. Imáxínote baixando do autobús da Senra, non sei si da liña de Curtis ou da Coruña y, como en aqueles tempos adoitaba chover seguido polo mes de octubre, conviría en pensar tamén para non rachar co tópico, coas rúas de Santiago moi ben molladas. Chegaron despois os anos da facultade, primeiro a carón dos teus compañeiros asturianos, como Fernández Pello ou Sordo, e despois en círculos cada vez máis amplos e variados, cos procedentes doutras comunidades: andaluces, como Florencio Moreno, extremeños como Benjamín Garrido, castellanos como Isaac, Marisa ou Carmina, vascos como Mamen ou Lucía, galegos, como eu mesmo, e así, ata un longo etcétera no que se resumía aquela Babel dos pobos de España que era a Facultade de Farmacia que coñecemos. Foron anos inesquecibles onde, ao par que nos formabamos con máis ou menos acerto como profesionais, fóronse tecendo tamén fortes e sinceiros vencellos de amizade que resistiron o paso dos tempos. Poderíamos falar daqueles paseos pola Ferradura, as excursións polo contorno como aquela que fixeramos a Poio e Armenteira, da tua debilidade polos doces de La Mora, do coro vasco e... de tantas e tantas lembranzas que farían este parlamento interminable. Pero o que non quero deixar de lembrar é de que cando fomos profesores novísimos, en Fonseca, e tentabamos arranxar o mundo. Cando menos o mundo da Farmacia. E, por suposto, cando chegaches casado con Loles, unha guapa moza asturiana. Cando naceron tuas fillas. E tamén... cando nos despedimos cunha cea no Castiñeiriño antes da tua marcha cara á universidade asturiana.

Agora volves ás terras compostelanas, cando xa levamos recorrido un bo treito da nosa vida e a tua familia alóngase en fillos e netos. E volves, acollido por esta ilustre institución académica que, se non é unha prolongación da Facultade de Farmacia, si tivo moito que ver moito con ela nos seus primeiros tempos, pois alí foi a súa primeira sede e a ela pertencen moitos membros desta Academia. Volves como ilustre representante da clase farmacéutica, con méritos abundos para pertencer a esta egrexia institución, pero para min, volves, sobre todo, como un

amigo, que se atopa de novo coas vellas sombras e lembranzas desta cidade que, queiramos ou non, todos levamos xa para sempre no máis íntimo de nos.

Moitas grazas.

Francisco Díaz-Fierros Viqueira

ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de ingreso como Académico Correspondiente

APORTACIONES DE LA FISIOLÓGÍA VEGETAL A LA FARMACIA

ILMO. SR. DR. RICARDO SÁNCHEZ TAMÉS

Santiago de Compostela

Julio de 2007

A mis padres, en el recuerdo.

*A Loles, siempre gozoso presente, por su constante apoyo y
comprensión.*

A Ester, María y Ricardo, a quienes algo di y mucho me dan.

*A Juan, Carmen y Santiago, que llevan el veinticinco por ciento de
mi ADN y son el futuro.*

INDICE

Prólogo

Antecedentes

El metabolismo secundario

Las plantas como suministradoras de principios activos

El cultivo de las plantas medicinales

Papel de la Fisiología Vegetal en el cultivo

Biotecnología

Descubrimiento del taxol

Producción de taxol

Estudio en *Taxus baccata* L.

Métodos biotecnológicos de obtención de taxol

- a) Proliferación de tallos
- b) Formación de callo
- c) Suspensiones celulares

Elicitores

Retirada del producto

Producción semiindustrial

Hongos endófitos

Epílogo.

PRÓLOGO

Excelentísimo Señor Presidente de la Academia de Farmacia de Galicia

Excelentísimos Señores. Académicos

Señora y señores.

Para quien ha tenido la suerte de formarse académicamente en Santiago de Compostela, y mas concretamente en Fonseca, estar en este acto al tiempo que se vienen celebrando los 150 años de la fundación de la Facultad de Farmacia, es un doble motivo de satisfacción. Hace poco asistí a dos celebraciones de esta efeméride: la Asamblea de Antiguos Alumnos en el mes de mayo y los actos organizados por el Decanato de la Facultad en el mes de junio. Esta es, por consiguiente, la tercera vez que vengo a Santiago en este año. Por estar hoy aquí a contaros algo de lo que he vivido en mi experiencia profesional quiero agradecer a la Academia de Farmacia de Galicia, a su presidente y miembros, el haberme elegido como Académico Correspondiente, honra, que por inesperada, me resulta agradabilísima y me llena de orgullo. Gracias de corazón.

Volver a Santiago es reencontrarme con ecos de una época feliz de mi vida, yo diría la más feliz, que comenzó con mi llegada en 1959 para estudiar Farmacia. Pero además de estudiar, había tiempo para jugar al parchís en la casa de La Parra o el Derby, o dedicarlo a las lecturas de teatro en el pabellón nuevo de Fonseca (Casona, siempre Casona), o actuar en el grupo del TEU en el Salón Teatro, o a cantar en el Orfeón Universitario, o en el coro vasco de Santa Águeda, o a salir de serenata con José María Rivera y los hermanos Romaní (Javier y Darío) o a procesionar el entierro de la sardina. ¡Tantas y tantas cosas!. Todo esto es para mi Santiago.

Aquí leí mi tesis doctoral, aquí disfruté de mis primeros años de becario y de PNN, aquí viví de recién casado y después nacieron mis dos hijas, ¡que mas cosas buenas me pudieron pasar en Santiago! Y llegó el año 1973 en que la obtención, por oposición, de la plaza de Agregado por oposición me llevó a Oviedo, donde ha transcurrido toda mi vida profesional

hasta hoy. Aquí, en Santiago dejé a mis viejos y buenos amigos, Florencio y Mariquilla, Paco y Maricha, José María y Teté a los que tanto quiero.

Tengo que dedicar mi mejor recuerdo, a la vez que satisfacción por que hoy nos acompañe, a mi maestro, D. Ernesto Vieitez, que me introdujo en el mundo de la Fisiología Vegetal, dirigió mi tesis doctoral y me animó a solicitar una beca March y así pude irme a Weed Research Organization en Oxford y luego a Bedford Collage de Londres, donde me inicié en el estudio de los herbicidas y su mecanismo de acción. Recuerdo al Prof. Bellot que me hizo sudar y amar a las plantas; al Prof. Montañés y su examen de fórmulas de Química Orgánica, al Prof. Serranillo, el mejor histrión que he visto nunca en un aula, ¡que gestos!, ¡que entonación de voz!. Aquí conocí de cerca y traté en la época fundacional de la Asociación de Antiguos alumnos al Prof. Cadórniga quien, como estudiante, me había casi atemorizado y luego en el trato próximo era una persona de una amabilidad y finura exquisita. No voy citar aquí a todo el claustro de profesores para no cansarles a ustedes, pero de todos guardo un buen recuerdo.

Y durante la realización de la tesis como no recordar a María Dolores Vázquez-Gesto, ¡que poco pudo disfrutar de su jubilación!, a Adelina Vázquez, a Suso Méndez, a María Cruz Mato, María Luisa Areses. Luego vinieron Gregorio Nicolás, Jorge Fernández Farrago (ambos catedráticos en Salamanca) y Nene y su sempiterno cigarrillo ¡que caro le costó!, e Ignacio Sara; y entre los vecinos de Botánica al bueno y querido Ramón Álvarez y a Elena González y a tantos compañeros del laboratorio, que citarlos a todos haría la lista muy larga.

Sin embargo no quiere dejar de dedicar un recuerdo al Prof. Francisco Sabater, maestro y amigo que con generosidad ilimitada de su tiempo me introdujo en el estudio de las enzimas, y yo a cambio, le guiaba por las carreteras y corredeiras de Galicia en excursiones domingueras.

Pero no estoy aquí para recordar tiempos pasados sino para contar la relación que la Fisiología Vegetal puede tener con el mundo del medicamento que es el ámbito que compete a la Farmacia.

ANTECEDENTES

El estudio de las plantas dentro de la Facultad de Farmacia se hace bajo tres puntos de vista. El conocimiento y descripción de las mismas que lo aborda la Botánica; el estudio de sus principios activos que es el ámbito de la Farmacognosia; y el estudio de su funcionamiento y regulación por las condiciones ambientales que es objeto de la Fisiología Vegetal

La última rama de las ciencias botánicas que se incorporó a los estudios de Farmacia fue la Fisiología Vegetal y la razón fue un tanto peculiar. Allá por los años cuarenta del pasado siglo D. José María Albareda, científico influyente en aquel tiempo, quiso incorporar en las enseñanzas de Ciencias Naturales nuevos sistemas de abordar el estudio de las plantas y del suelo, esta idea no fue aceptada por los naturalistas de la época, eminentemente descriptivos y poco experimentales. Entonces propuso incorporarlas a los estudios de Farmacia con la disculpa de que el farmacéutico rural podía ejercer una influencia sobre los campesinos haciéndoles llegar los nuevos conocimientos de Fisiología Vegetal y de Edafología. Y así se incorporó la Fisiología Vegetal a los estudios de Farmacia y a poco que nos descuidemos pronto dejará de estar, pues con cada reforma del plan de estudios se le da un nuevo recorte.

EL METABOLISMO SECUNDARIO

Las plantas son organismos inmóviles, por tanto para relacionarse con el entorno tuvieron que desarrollar mecanismos que les permitieran atraer o repeler a otros organismos en función de su supervivencia. Además de estructuras atrayente (color, forma) o repelentes (espinas, pelos urticantes), las plantas producen sustancias repelentes o tóxicas para los posibles depredadores impidiendo así el ataque y colonización del tejido vegetal.

¿Qué producen las plantas con tal fin? Los llamado productos secundarios o metabolitos secundario o productos naturales (todas ellas denominaciones poco apropiados). Aunque los productos del metabolismo secundario se han definido históricamente como compuestos que no parecen jugar un papel bioquímico vital en el proceso de construir y mantener las células vegetales, en los últimos años se ha demostrado que estos compuestos juegan un papel muy importante en la ecofisiología de las planta; y así pueden desempeñar un papel defensivo contra herbívoros o ataques de patógenos, o en relaciones de competición entre plantas, en otros casos pueden actuar como atrayentes de organismos beneficiosos, ya sean insectos polinizadores que libarán en sus flores, u organismos simbioses. También pueden desempeñar estos metabolitos secundarios un papel protector frente al estrés abiótico como el asociado con cambios de la temperatura, régimen hídrico del suelo, intensidad de irradiación luminosa, exposición a la luz ultravioleta y nivel de nutrientes minerales o presencia de elementos minerales tóxicos en el suelo **24**. Incluso se les atribuye un papel a nivel celular como reguladores del crecimiento, moduladores de la expresión génica y en la transducción de señales. Algunas de esas sustancias son aprovechadas por el hombre como aromatizantes (limoneno, pineno, mentol), colorantes (shikonina) o medicamentos (quinina, codeína, morfina).

Es la fisiología peculiar de cada especie la que ha desarrollado los diferentes mecanismos que se engloban dentro del concepto de metabolismo secundario, que junto con la regulación de las grandes rutas del metabolismo primario constituyen el campo de estudio de Fisiología Vegetal, es decir: *"la ciencia que estudia las respuestas de los organismos vegetales, o*

partes vivas de los mismos, frente a agentes externos o internos variables".

Según el Diccionario de la Real Academia Española, en su primera acepción, Farmacia es la “*ciencia que enseña a preparar y combinar productos naturales o artificiales como remedios de las enfermedades, o para conservar la salud*”. En nuestro caso vamos a fijarnos en los productos naturales de origen vegetal, y la Fisiología Vegetal será un instrumento o un medio capaz de suministrar estos productos naturales en cantidad y calidad suficiente para que el Farmacéutico pueda desarrollar su ciencia.

Vemos, por tanto, que el ámbito de estudio de la Fisiología Vegetal es necesario en Farmacia, mas bien diría que imprescindible, no tanto por las razones aducidas para su introducción en los estudios de la licenciatura, sino por razones mucho mas poderosas e importantes desde el punto de vista de la producción de principios activos o metabolitos secundarios.

LAS PLANTAS COMO SUMINISTRADORAS DE PRINCIPIOS ACTIVOS.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calculó que más del 80 % de los habitantes de los países pobres dependen de las plantas para su curación. Casi el 25% de las prescripciones que se hacen en el mundo son de origen vegetal, 121 de esos compuestos activos son de uso corriente. De los 252 medicamentos considerados básicos y esenciales por la OMS, 11% son extraídos exclusivamente de plantas y un número significativo de medicamentos sintético se obtienen a partir de precursores naturales. Como ejemplo de medicamentos importantes obtenidos de plantas tenemos la dígoxina procedente de *Digitalis spp.*, quinina y quinidina que se obtienen de *Cinchona spp.*, vincristina y vimblastina a partir de *Catharanteus roseus*, atropina de la *Atropa belladonna* y morfina y codeína de *Papaver somniferum*. Se calcula que el 60% de las drogas antiinfecciosas y antitumorales que están en el mercado o en ensayos clínicos son de origen natural. Y la gran mayoría de estos compuestos no pueden ser sintetizados económicamente y hay que obtenerlas de las plantas silvestres o cultivadas.

Aproximadamente los dos tercios de las, alrededor de 50.000 especies medicinales en uso son producto de la recolección de plantas silvestre, y en Europa solamente el 11% de las plantas medicinales utilizadas comercialmente son cultivadas. Esto plantea problemas serios acerca de la influencia que la excesiva presión de los recolectores puede plantear sobre el mantenimiento de las poblaciones, la pérdida de variabilidad genética, extinción en ciertas localidades y degradación del hábitat. Se calcula que entre 4.000 y 10.000 especies pueden estar en peligro, entre otras *Arctostaphylo uva-ursa*, *Piper methysticum* y *Glycyrrhiza glabra* (regaliz).

EL CULTIVO DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Que duda cabe que el conocimiento de las drogas, o drogas crudas según los anglosajones es el ámbito de la Farmacognosia, pero, si queremos hacer algo diferente a lo que la naturaleza nos proporciona, otras ciencias deben participar. La primera que aportó algo en este sentido fue la Agricultura, no es lo mismo recoger plantas silvestres que cultivarlas en condiciones adecuadas, donde se puede mejorar su rendimiento simplemente con la utilización de unas prácticas agrícolas adecuadas. Por otra parte el cultivo supuso un freno para la sobreexplotación y riesgo de extinción de aquellas especies que crecían en ecosistemas frágiles, donde un afán desmedido de recolección ponía en peligro, no sólo la presencia de los individuos sino la disminución de la biodiversidad. La moda de lo ecológico y natural, puede volver a poner en entredicho las ventajas del cultivo, hay gente muy “ecológica” que pagará lo que sea porque su tisana, o su infusión y no digamos su “medicina” proceda de fuentes naturales. Esto acarrea de nuevo el peligro de extinción de numerosas especies por la recolección indiscriminada en la naturaleza.

Pero llega un momento en que esto ya no es suficiente, incluso el cultivo de especies no es viable en muchos casos, por la incapacidad o dificultad de germinación de las semillas, la dificultad o imposibilidad de multiplicación por esquejes. Incluso una planta cultivable, puede no ser rentable su cultivo en la forma tradicional de crecimiento y hay que domeñarla para que la obtención de la materia vegetal sea factible y económicamente rentable. Hagamos mención de la diferencia que puede haber en la recolección de hojas de *Ginkgo biloba* de un árbol crecido de forma natural o en una plantación donde eliminando la dominancia apical, proceso fisiológico controlado por la auxina, se favorece la ramificación manteniendo un crecimiento reducido, de porte arbustivo, que facilita la recolección.

El cultivo nos suministra medios para optimizar la producción y conseguir un producto uniforme y de calidad **7**. La decisión de que plantas pueden ser cultivadas no es fácil, para algunas como *Ginkgo biloba* o *Hypericum perforatum*, la decisión ya está tomada, aunque no sean especies amenazadas por la recolección silvestre. Para otras dependerá de la evolución del mercado o de la mayor o menor facilidad de su cultivo **2**.

PAPEL DE LA FISILOGIA VEGETAL EN EL CULTIVO

Hay especies que sería interesante cultivar pero presentan problemas fisiológicos que hay que superar o controlar para hacerlas rentables y aquí entra la Fisiología Vegetal. Existen semillas que germinan mal o no germinan si no se les somete previamente a algún tratamiento, por ejemplo estratificación o sea someterlas tras ligera imbibición a un período frío, en el caso de *Panax quinquefolium* (Ginseng americano) un control del ambiente, acorta el periodo de estratificación, necesario para que se produzca un mayor porcentaje de germinación de semillas y además lo hagan en cualquier época del año. El control ambiental (invernaderos) o los cultivos hidropónicos pueden contribuir a que plantas de difícil cultivo puedan llevarse a escala comercial.

Este mismo control del medio puede servir en algunos casos para mejorar la variación fenotípica de la concentración de los compuestos que interesan a la hora de la recolección. La idea sería reducir los niveles de compuestos tóxicos e incrementar la de los principios activos. La fisiología de la plantas responde a cambios en el ambiente, variando su metabolismo, y naturalmente es el denominado metabolismo secundario el que a nosotros nos interesa, y así fluctuaciones de la temperatura e iluminación generan un incremento en antioxidantes, ante situaciones de estrés puede responder la planta incrementando el contenido en prolina, como respuesta a una infección incrementando los niveles de flavonoides, o aumentando el contenido de alcaloides como respuesta ante los ataques de herbívoros.

Ilustrémoslo con un ejemplo, la *Atropa belladonna* cultivada en el Cáucaso tiene un contenido de alcaloides de 1,3%, las mismas plantas cultivadas en Suecia alcanzan un 0,3%. La *Mentha piperita* crecida en la sombra tiene menos aceites esenciales (1,09%) que la que crece al sol (1,43%) y del total de aceites esenciales las plantas de sombra tienen 57,5% de mentol mientras que las de sol llegan al 61,8%. *Papaver somniferum* crecido en climas fríos tiene mas morfina, pero menor porcentaje de alcaloides que la que crece en climas templados.

Vemos que las condiciones ambientales de luz y temperatura influyen, pero otros factores como el estrés hídrico, la presencia de microorganismos del suelo y variaciones del pH

y nutrientes también afectan al contenido de metabolitos secundarios **46**.

Lo que se pretende conseguir con el cultivo, es incrementar o estabilizar la concentración de los compuestos biológicamente activos deseados y reducir la presencia de toxinas intrínsecas. Volvamos al *Ginkgo biloba* cuyos extractos se estandarizan con un contenido de glucósidos flavonoides del 24-27% y un 6-7% de lactonas terpénicas y el ácido ginkólico, que es tóxico por debajo de 5 ppm. Esto se hace durante el proceso de extracción, pero si se seleccionan genotipos que produzcan extractos próximos a las características descritas, y más aún, si se logran identificar de forma temprana se simplificaría y reducirían los costes de extracción.

Cultivar las plantas es una de las posibles soluciones a estos problemas ya que además permitiría el uso de diversas biotecnologías con el fin de resolver alguno de los problemas inherentes a la producción de plantas medicinales: la identificación errónea, variabilidad genética y fenotípica, variabilidad e inestabilidad de los extractos, presencia de componentes tóxicos o contaminantes **25**.

BIOTECNOLOGIA

Hoy en día el cultivo y mejora mediante la genética mendeliana, ha sido superada por nuevas técnicas que permiten manipular la expresión génica de las plantas medicinales, no sólo en busca del mayor rendimiento del producto activo, sino también mejorando las características agronómicas (uniformidad, estabilidad, crecimiento y desarrollo, resistencia a estrés biótico y abiótico).

Habrán casos en que el cultivo de la planta entera no sea viable y habrá que llegar a obtener el metabolito a partir del cultivo de órganos de la planta, o incluso de células aisladas crecidas en suspensión **29**. Todas estas alternativas pueden ser abordadas desde la Fisiología Vegetal pues, como definíamos al principio, su ámbito de estudio abarca desde el individuo o la población, hasta la célula vegetal. Y no digamos nada si alteramos la fisiología de la célula influida por el entorno o regulada desde el genoma (y aquí entra la utilización de la ingeniería genética) para favorecer el proceso o procesos que llevan a la producción del principio activo de interés.

Se utilizan técnicas de propagación *in vitro* para la producción masiva de plantas. Puede partirse de prácticamente cualquier órgano o tejido de la planta, así se obtienen múltiples tallos a partir de explantos formados por uno o dos entrenudos, o se pueden obtener tallos y plantas, tras su posterior enraizamiento, a partir de hojas, de raíces, de cotiledones, de embriones y favorecer posteriormente la multiplicación clonal de las plántulas así obtenidas. Incluso se ha llegado a la micropropagación en sistemas automáticos o semiautomáticos que permiten, mediante micropodas la obtención de millones de plantas en un espacio reducido y en un período de tiempo realmente breve. Así se obtienen hoy multitud de frutales, plantas ornamentales y algunas plantas medicinales como *Valeriana officinales*, *Thymus piperella*, *Origanum vulgare* o *Genciana* sp. a escala comercial.

Fue allá por los años 30 del pasado siglo que Gautheret **18** y White **40**, demostraron que las células y tejidos vegetales podían ser cultivados por largos períodos de tiempo en un medio adecuado. Posteriormente el mismo White demostró que un callo podía tener un

crecimiento indefinido. Hoy día el cultivo de células o tejido *in vitro* se ha convertido en una técnica casi rutinaria en numerosos laboratorios. A lo largo de los años 70 y 80 las suspensiones celulares se consideraron como el medio mas adecuado para el estudio del metabolismo secundario e incluso para la producción de metabolitos secundarios a escala industrial. Esto llevó al establecimiento de cultivos celulares de gran número de plantas medicinales desarrollándose técnicas de cultivo a gran escala en birreactores, no sólo de células sino de órganos **30**.

Pero otro aspecto importante es que mediante la aplicación adecuada de hormonas vegetales las células vegetales cultivadas *in vitro* pueden experimentar divisiones coordinadas y dar lugar a estructuras complejas como raíces, tallos embriones somáticos y por último plantas completas. También se dispone de una serie de técnicas básicas de cultivo *in vitro* que, partiendo de diversos materiales, permiten no sólo la obtención de callos y suspensiones celulares, sino la embriogénesis y organogénesis. Es posible realizar la multiplicación masiva de una planta, para formar un clon, a partir de un único individuo formado tras la germinación de una semilla, puede aislarse el embrión de una semilla y hacerlo germinar *in Vitro* lo que anula la dormición impuesta en muchas semillas.

El callo formado en la zona de corte de un explanto, una vez alcanza cierto tamaño puede separarse y ser cultivado, de forma independiente, durante largos períodos de tiempo, si se mantienen las condiciones de esterilidad. Para mantener la homogeneidad de las células constitutivas del callo hay que utilizar protocolos muy estrictos tanto en cuanto a la composición del medio de cultivo como a las condiciones ambientales. Los callos contienen células meristemáticas que son consideradas totipotentes y cuya diferenciación y posterior evolución se puede determinar mediante la aplicación controlada de hormonas, de tal forma que se puede dirigir la organogénesis en el sentido de mantener el crecimiento del callo, inducir la formación de hojas, o la de raíces.

Se puede inducir organogénesis a partir de células no meristemáticas de un tejido vegetal. En este proceso, determinadas células se convierten en meristemáticas, a veces pasando por una etapa de formación de callo, lo que permite la obtención de numerosos tallos,

que tras su posterior enraizamiento se convierten en plantas. El éxito de este proceso viene determinado por la fisiología y edad de la planta u órgano en que se quiere inducir el proceso al que se denomina micropropagación y que permite la rápida obtención de un número elevado de plantas de interés.

Por otra parte, estos callos si se sumergen en un medio líquido y se someten a agitación se desintegran en pequeños grumos celulares, lo que permite obtener suspensiones celulares que se pueden mantener en estado desdiferenciado durante largos periodos de tiempo. Esta característica permite cultivar las suspensiones celulares en birreactores, lo que llevó a utilizarlas para la producción de metabolitos secundarios **38**. El esfuerzo en la puesta a punto de cultivo de suspensiones celulares para obtener metabolitos de interés, presenta algunas ventajas:

a) La obtención de un metabolito no depende de situaciones geográficas, o de condicionantes políticas o sociales.

b) Los sistemas y protocolos de producción están muy experimentados y llevan a la obtención de productos de calidad y en cantidad rentable.

c) Incluso se pueden obtener directamente productos no enteramente naturales o mediante biotransformaciones a partir de precursores más abundantes, llegar al producto que interese.

Se pensó en un principio que todas las células capaces de producir un determinado metabolito en la planta, también lo harían en cultivo *in vitro*, esto no siempre es así, aunque hay algunos casos de cultivos celulares que son capaces de acumular cantidades del metabolito secundario en mucha mayor proporción que las que se acumulan en la planta intacta.

Otro problema surge cuando el metabolito está asociado a determinado órgano de la planta, o su producción solamente tiene lugar durante determinado estado de desarrollo, en este caso las suspensiones celulares no pueden ser la solución y habrá que pensar en el cultivo en gran escala de órganos, sean raíces o tallos **36**. Así se pueden cultivar *in vitro* pelos radiculares de *Atropa belladonna* transformadas mediante *Agrobacterium rizhogenes* para la obtención de alcaloides del tropano.

Las posibilidades que se abren con estas nuevas técnicas de cultivo, son que podemos controlar y modificar la fisiología de las células y así se pueden obtener más y mejores plantas o, lo que a nosotros nos interesa, producir más metabolitos secundarios de los que se obtendrían en las condiciones normales de crecimiento de las plantas.

Se ha aplicado la biotecnología para producir precursores de medicamentos, nutrientes o pesticidas, por ejemplo, en los tricomas de *Mentha piperita* se ha modificado la producción de aceites esenciales y aumentado la resistencia de la planta frente a infecciones fúngicas y estrés abiótico. El sistema de cultivo *in vitro* que permite el crecimiento de órganos, explantos, tejidos células o protoplastos, se ha utilizado para modificar, mediante vectores bacteriano, concretamente *Agrobacterium rhizógenes*, la producción de metabolitos secundarios y así se han modificado: *Papaver somniferum*, *Artemisia spp.* algunas solanáceas, *Taraxacum platycarpum*. Mediante *Agrobacterium tumefaciens* se han transformado *Taxus*, *Echinacea*, *Scrophularia*, *Digitalis*, *Thalictrum* y *Artemisia*. Algunos de estos tejidos o células modificadas permiten la regeneración de plantas, pero hay casos como *Ginkgo biloba* que son recalcitrantes. En otros casos el empleo de la biolística ha permitido la introducción de genes de difícil inserción en el genoma de la planta huésped. Este aspecto de la regeneración puede resultar útil gracias a la variabilidad somaclonal que se produce en el cultivo *in vitro* inducida por estas técnicas y que amplía las posibilidades de obtener mayor biodiversidad, incluso la micropropagación y la embriogénesis somática tienen interés para poder realizar cruzamientos y sobre todo para la producción masiva del material ya sea seleccionado o manipulado genéticamente.

Las células o tejidos cultivados *in vitro*, están sometidas al riesgo de que se produzcan mutaciones espontáneas, a veces, esta inestabilidad genética interesa potenciarla mediante la aplicación de agentes físicos o químicos. Este fenómeno puede ser aprovechado cuando la mutación favorece nuestros fines, pero puede ser una rémora si las células mutadas no mantienen la producción del metabolito y muestran una tasa de división mayor que las células productivas llevando a una disminución de la productividad del cultivo. Esto constituye un problema ya que cuando se comercializa una línea celular altamente productora puede suceder

que pierda esta característica a lo largo del cultivo. Por ello las células metaestables, lo son mas en función de un estricto protocolo de cultivo que consecuencia del origen clonal de las mismas **16, 35.**

La selección de las células se puede hacer de varias formas, en una masa de callo se pueden diferenciar distintas zonas por el color, si el producto que se busca es un pigmento **17.** A veces la coloración no tiene nada que ver con el producto, sino con la presencia de sustancias de tipo fenólico. A veces la búsqueda de células con capacidad de producir el metabolito de interés, se transforma en un fracaso como es el caso de *Papaver somniferum*, en que la búsqueda de células capaces de producir codeína en grandes cantidades no ha sido posible, hasta la fecha, en ningún laboratorio del mundo, porque los células de *P. smniferum* cultivadas en suspensión no son capaces de producen cantidades apreciables de morfinaos.

DESCUBRIMIENTO DEL TAXOL

Pero mejor que seguir hablando de generalidades creo que sería conveniente ilustrar todo esto con un ejemplo tan actual y para nosotros cercano, como el descubrimiento del taxol **47**. Realmente el nombre registrado de este compuesto es Paclitaxel, ya que la propia empresa Bristol-Meyer Squibb había utilizado el nombre taxol en uno de sus productos comerciales; sin embargo casi todo el mundo utiliza el nombre primeramente atribuido.

Que duda cabe que cualquier cosa que se descubra para luchar contra el cáncer, o contra los cánceres, es noticia bienvenida, de hecho el 60% de los ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer, se hacen con productos naturales, compuestos derivados de productos naturales o contienen farmacóforos derivados de productos naturales.

El Cancer Chemotherapy National Service Centre (CCNSC) desarrolló y financió entre los años 1960 y 1986 un programa de barrido sobre 35.000 especies en busca de actividad anticancerígena, de ahí llegaron a aislarse 2.000 compuestos y se hicieron ensayos en cultivos celulares para estudiar su actividad contra el linfocito P₃₈₈ de la leucemia y el carcinoma KB **9,10**. De estos estudios surgieron unos cientos de plantas con insospechada actividad anticancerígena entre ellas *Taxus brevifolia* o Tejo del Pacífico, del que se llegó a aislar e identificar en 1969 una sustancia denominada en principio Taxol, (Kingston 1993) y como ya hemos dicho, mas tarde rebautizada Paclitaxel. Este compuesto tenía una cierta actividad en ensayos de leucemia P-388 y L-1210, pero no era nada extraordinario comparado con otros compuestos que eran activos en estos mismos ensayos **39 y 44**.

En principio, el taxol presentaba dos graves inconvenientes. El primer problema que se planteaba era la dificultad del suministro, ya que obtenerlo a partir de la corteza de *T. brevifolia* constituía un proceso laborioso y de bajo rendimiento, se necesitaba la corteza de tres árboles para obtener un gramo de Taxol y, en aquel entonces, no se conocía ninguna otra fuente para obtener Taxol.

El segundo problema era el de la solubilidad, hubo que superar muchas dificultades, que estuvieron a punto de hacer abandonar el estudio del Taxol como anticancerígeno. Sin

embargo se pusieron a punto nuevos métodos de valoración de actividad anticancerígeno en cáncer de colon, de mama, de pulmón y el melanoma B16 de ratón. De todos los compuestos ensayados, los mejores resultados se obtuvieron con Taxol, incluidos varios tumores sólidos humanos como el MX-1 de mama. Basado en estos resultados en 1955 se comenzó a desarrollar el Taxol como agente anticancerígeno y todavía resultó más interesante cuando se llegó al descubrimiento de su mecanismo de acción. Este compuesto resultó que actuaba de forma contraria a como lo hacían los anticancerígenos conocidos hasta el momento.

En el proceso de mitosis celular juega un papel importante la tubulina, que es una proteína que existe en dos formas α y β , ambos polipéptidos se acoplan formando unos microtúbulos huecos que participan en la separación de los cromosomas, una vez finalizada la mitosis los microtúbulos se desacoplan y se regeneran las dos formas de tubulina. Los anticancerígenos conocidos hasta el momento se creía que actuaban impidiendo la formación de los microtúbulos, por el contrario, este nuevo compuesto natural promueve el ensamblaje de los microtúbulos y se une a ellos estequiométricamente de forma no covalente, los estabiliza e impide su desacoplamiento en las dos subunidades de tubulina y como consecuencia inhibe la replicación celular que, en último término, lleva a la muerte celular **8, 10**.

En 1983 comenzaron los ensayos clínicos y los primeros resultados fueron desastrosos, debido a que el coadyuvante utilizado para facilitar la solubilidad del compuesto que hiciera posible su administración causaba reacciones alérgicas. Más tarde la Food and Drug Administration aprobó los tratamientos clínicos para ensayos en cáncer de mama y de ovario y posteriormente se vio que era efectivo contra el melanoma maligno, el cáncer de pulmón y otros tumores sólidos **41, 42**. Hoy se le considera como el prototipo de una nueva clase de agentes anticancerígenos.

PRODUCCIÓN DE TAXOL.

El problema más difícil en la producción de Taxol es la limitación del suministro, debido a que su extracción se hacía a partir de la corteza del Tejo del Pacífico donde se encuentra a una concentración muy baja, del orden de 0,001% en peso seco, el otro factor limitante lo constituye el lento crecimiento de estos árboles . Un tejo de 100 años produce una media de 3 kg de corteza y de ahí se extraen 300 mg de taxol, que sirve solamente para una dosis en un programa de tratamiento de cáncer. Para obtener 1 kg de taxol hacen falta alrededor de 7.000 Kg de corteza seca lo que supone talar unos 3000 árboles **9, 10**. Y para tratar a un solo paciente hacen falta 2 g de taxol, es decir 1 kg alcanza para 500 pacientes solamente.

De aquí que se planteara la necesidad de proceder a recuperar las plantaciones de *T. brevifolia* creándose a principios de los años noventa del siglo pasado, empresas dedicadas a la multiplicación de Tejo del Pacífico a partir de esquejes de ramas, sin embargo la tasa de multiplicación y de crecimiento de estos es tan baja y la demanda de Taxol tan elevada que no se podía pensar en obtener plantaciones de tejos en un tiempo suficiente para reponer las pérdidas y satisfacer la demanda del mercado

Otra alternativa, era la síntesis del compuesto a escala industrial, pero el proceso resultó tan complejo y laborioso debido a la estructura de esta molécula que es económicamente impensable **9, 27**.

Posteriormente se vio que la planta produce otros taxanos como Deacetil Baccatina y 10-Deacetil Baccatina III que se encuentran en mayor proporción que el Taxol y que estos compuestos constituían una alternativa viable y muy atractiva como compuestos de partida para, sintetizar Taxol, además se pueden introducir diversos sustituyentes en la cadena lateral que produzcan compuestos interesantes, sea por su mejor solubilidad o mayor actividad, como es el caso del compuesto Taxotere

ESTUDIOS EN *Taxus baccata* L.

Otra posibilidad era buscar fuentes alternativas de Taxol, para ello se hicieron estudios en las distintas especies del género *Taxus* y, naturalmente, llamó nuestra atención el tejo, teso, o teixeiro (*Taxus baccata* L.) ampliamente distribuido por toda Asturias y Norte de España. El inicio de nuestros trabajos fue posible gracias a que dos jóvenes investigadores: Marta Sierra y Juan Pedro Majada, obtuvieron la primera beca de investigación Severo Ochoa, patrocinada por el Ayuntamiento de Oviedo, con un proyecto que pretendía llegar a la producción de taxol bajo una doble perspectiva comercial y conservacionista. Se hizo un barrido del contenido de Taxol en hojas de tejos crecidos en Asturias en diferentes suelos, altitudes y orientaciones y se concluyó que las hojas de los árboles analizados presentaban una gran variabilidad, del orden de 30 veces en el contenido de taxanos, es decir, la suma de paclitaxel, baccatina y 10-deacetil baccatina III oscilaba entre 7,82 y 214,54 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco. Esta diferencia de contenido en taxanos estaba influida por el sexo, el tipo de suelo y la altitud a que crecían los árboles. Los mejores individuos eran hembras que crecían sobre suelos silíceos, entre 1000 y 1250 m de altura **24**. Esto ya era un indicio de que podrían utilizarse fuentes alternativas a la decorticación de los árboles y por tanto presentaba una ventaja conservacionista. Por otra parte, en estos tejidos el contenido de 10-deacetil baccatina III era muy elevado y este compuesto, hemos dicho anteriormente, que puede utilizarse como punto de partida para la hemisíntesis del Taxol.

Estos resultados nos permitían afrontar el problema de la producción de taxol a partir del *T. baccata*, mediante una técnica no destructiva, pues se podían hacer podas controladas de las ramas, permitiendo que rebrotaran y de esta forma mantener un aporte continuo de material de partida para la obtención del producto y siendo respetuosos con la conservación del medio.

Sin embargo, el proceso de selección de árboles era lento y nada rentable.

El siguiente paso era la obtención de individuos altamente productivos, para poder clonarlo y garantizar un suministro de taxanos suficiente que pudiera atender las necesidades del mercado. La clonación mediante esquejado ya se había puesto en práctica en Canadá, por

algunos viveros comerciales, para producir *T. brevifolia*, pero el procedimiento resultaba poco esperanzador. Existen técnicas más eficientes para la selección y obtención de clones altamente productivos en taxanos

MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS DE OBTENCIÓN DE TAXOL

a) PROLIFERACION DE TALLOS

A partir de semillas maduras de *T. baccata*, y una vez superado el periodo de dormición mediante eliminación manual de la cubierta y sometidas a un lavado en agua corriente, se aislaron los embriones que tras geminar, dieron lugar a la obtención de 80 plántulas que se utilizaron como punto de partida para inducir la proliferación de tallos e iniciar un programa de propagación clonal **31, 33**. Al cabo de tres subcultivos se sumó el número de tallos producidos en clones originado a partir de cada explanto, ya fueran de secciones apicales o de secciones basales, siendo estas últimas las que más tallos producían, al no estar sometidas a dominancia apical las yemas axilares, la producción de tallos era máxima en un medio enriquecido en sales de amonio como fuente de nitrógeno, en presencia de una hormona (BAP y adicionando carbón activo al medio de cultivo. Al cabo de tres subcultivos las secciones apicales mostraban tasas de multiplicación análogas a las secciones basales. Al cabo de seis meses casi todos los tallos enraizaban espontáneamente.

Esto abrió las puertas a la producción masiva de plantas de tejo lo que permitiría introducir programas de repoblación o de cultivo con lo que el problema ambiental estaría superado. Esta obtención masiva de plantas enraizadas estaba ligada a la utilización de un sistema automático de cultivo y micropodas seriadas que se ha desarrollado en el Área de Fisiología Vegetal gracias a un proyecto de colaboración con la empresa ADEPRO **30**. Este sistema permitiría llegar a la plantación de huertos que podrían ser una fuente relativamente abundante de Taxol, aunque el crecimiento de *T. baccata* es lento, en este caso solamente se aprovecharían las hojas y una poda controlada permitiría la recolección continuada de material para ser sometido a extracción sin poner en peligro la supervivencia del árbol. Se encontró que los clones que mostraban mayor tasa de crecimiento eran los que tenían un mayor contenido en 10-deacetilbaccatina II y menor de Taxol, por tanto estos podrían ser una fuente de este compuesto para la posterior hemisíntesis del Taxol.

Sin embargo, siempre cabe buscar procedimientos más rápidos, más eficaces y

probablemente más rentables para la obtención de Taxol.

b) FORMACION DE CALLO

La variabilidad genética de las plantas fue el punto de partida para seleccionar dos clones, uno por su elevado contenido en taxanos y otro que presentaba valores mas bajos y se procedió a inducir la formación de callo en explantos de hojas. Aunque se ha logrado la inducción de callo en diferentes tejidos (corteza, tallo, arilos verdes y rojos, partes de semillas, tallos jóvenes y hojas) nosotros partimos de hojas que se colocaron en un medio de cultivo solidificado con agar, que además de nutrientes minerales se le añadió las hormonas necesarias para mantener su proliferación. Los callos crecían mostrando zonas de color marrón debido a la presencia de compuestos fenólicos que cuando se aislaban y sembraban en medio fresco crecían muy poco; había otras de un color amarillo pálido que fueron aisladas y repicadas a nuevo medio de cultivo, obteniéndose una línea de rápido crecimiento y elevada producción de 10 Deacetyl Baccatina III, aunque pobre en Taxol. Esto reforzaba la posibilidad de utilizar estos callos para la hemisíntesis de Taxol u otros productos relacionados, con actividad terapéutica **33.**

Sin embargo el mayor inconveniente de utilizar callo como fuente de taxanos radica en que hay que proceder a su extracción y este es un proceso laborioso.

c) SUSPENSIONES CELULARES

Hacen falta métodos alternativos para poder atender estas necesidades y además hacerlo de forma constante y uniforme a lo largo del año. El cultivo de células es un sistema que puede resolver alguno, sino todos, estos problemas. Previamente habrá que calcular si los costos de producción y la demanda justifican el empleo de estas biotecnologías. El objetivo es mejorar la productividad de las células con el fin de hacer viable la producción de estos compuestos. En muchos casos hay que recurrir a diversas técnicas para lograr un elevado aumento en la producción celular **1**, como inmovilizar las células en perlas de alginato. Se han ensayado sistemas de cultivo en suspensión continua por ser un método económico con bastantes buenos

resultados **38** e incluso explotado a nivel comercial en varias empresas.

Aunque en un principio los niveles de producción de Taxol en cultivo eran bajos **14**, **21**, **42** los niveles hoy día andan por 10 a 22 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **20**, **28** e incluso mayores 119 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **44** y 153 $\mu\text{g.L}^{-1}$ **6**. Esto se logró gracias a la optimización del medio de cultivo, eliminando el aporte de nitrógeno amoniacal y sustituyéndolo por nitrato potásico, o mediante la adición de fructosa, fenil alanina u otros aminoácidos en cultivos celulares de *T. cuspidata* **15**.

También es importante para el inicio y mantenimiento del cultivo así como la producción de taxanos la proporción de células en el inóculo inicial y el volumen del mismo. Si se mantiene.

La adición de precursores, como fenil alanina multiplica por cinco la producción de taxanos. El mevalonato aunque en principio no dio resultados muy estimulante, posteriormente se vio que incrementaba la producción de taxanos y, lo mas interesante era, que favorecía la excreción al medio sin la adición de agentes permeantes.

Aunque los resultados con suspensiones celulares de *T. baccata* fueron esperanzadores, actualmente han sido mejorados por cultivos celulares de otras Taxáceas. Hoy se explotan comercialmente líneas celulares obtenidas, entre otros, de *T. brevifolia* o *T. cuspidata* capaces de producir taxanos en niveles muy superiores a los de las hojas o de la corteza.

ELICITORES.

Los elicitores, o provocadores o inductores, son moléculas capaces de inducir la producción de metabolitos secundarios **4**. Los elicitores pueden ser Bióticos o Abióticos, entre los primeros puede haberlos definidos (Quitosan, Alginato, Pectina, Quitina) o complejos (Homogalacturanos, Extractos de levadura, Esporas de hongos); entre los segundos los hay químicos (Ortovanadato, vanidil sulfato, sales de metales pesados) o físicos (estrés térmico, estrés osmótico, irradiación con UV, lesiones). A su vez cada uno de ello puede ser general o específico, actúan sobre el metabolismo secundario alterando la tasa de biosíntesis, acumulación o tránsito vacuolar, el recambio o la degradación. La elicitación se usa para inducir la expresión de genes, asociados frecuentemente con enzimas responsables de la síntesis de los metabolitos secundarios, porque imitan la respuesta de la planta frente a patógenos o lesiones.

En *Taxus* spp. extractos o filtrados del medio de cultivo de diversos hongos incrementan la producción de Taxol o análogos. En *T. chinensis* la acción del hongo *Aspergillus Níger* un hongo endófito que infecta el interior de la corteza de esta especie y renovación del medio incrementa la producción de paclitaxel mientras que en *T. cuspidata* se consigue el aumento con la acción conjunta de etileno y jasmonato **13**.

Sin embargo *Fusarium oxysporum* se ha mostrado un elicitor muy efectivo al inducir un incremento de 8 veces en la producción de Taxol en *T. chinensis* y de 10 veces la de Taxol y 20 la de 10 Deacetil Baccatina III en *T. media*.

Se han utilizado como elicitores otros compuestos, solos o combinados, así el ión Co, el nitrato de plata, el citrato amónico junto con ácido salicílico o el metil jasmonato.

La aplicación de diversos elicitores bióticos o abióticos durante diferentes etapas del crecimiento de una suspensión celular de *T. baccata* multiplicó por 16 la producción de taxol. Las sales de La, Ag y Co fueron efectivas en inducir la producción en cultivos celulares **44**.

Metil jasmonato ha mostrado ser un elicitor muy eficiente, incrementando la producción de Taxol en *T. media* (pasa de 28 a 110 mg.L⁻¹) y *T. baccata* (pasando de 0,4 a 48

mg.L⁻¹) **44**. El incremento en la producción de Taxol por aplicación de metil jasmonato, aun se mejora si se añade simultáneamente etileno en el bioreactor y aun más todavía si se añade azúcar**43, 45**.

Extractos celulares o filtrados del medio de cultivo de hongos también actúan como elicitors en suspensiones celulares de *Taxus* spp. **9** solos o asociado a la renovación del medio *T. chinensis* o incluso aplicado junto con ácido salicílico que no sólo favorece la producción de taxol sino que incrementa la producción de biomasa.

Se ha visto que *Fusarium oxysporum* es el mas eficaz, entre otras siete especies como elicitor de la acumulación de taxanos, ya sea el extracto del hongo o en combinación con otros elicitors se han logrado incrementos de taxol de 10 veces y de baccatina III de 20 veces **12**.

Existen otros factores, no bien conocidos, que regulan la producción de Taxol, así una mezcla de tres líneas celulares con diferente capacidad de síntesis, producen más taxanos que el valor medio de las tres líneas celulares cuando se cultivan conjuntamente con el elicitor metil jasmonato, pero este compuesto no es el primer factor en el estímulo de la producción **5**. El ámbito de estudio de los elicitors es un capítulo donde aún quede mucho trabajo que hacer **21**.

RETIRADA DEL PRODUCTO

La producción de un metabolito secundario puede llegar a una situación estacionaria sino se permite la salida hacia el medio de cultivo del producto sintetizado y acumulado en la célula, muchas veces en el interior de la vacuola, siendo poco o nada excretado al medio. En las condiciones de cultivo establecidas para suspensiones celulares, se ha obtenido un 28% de taxanos excretados al medio de cultivo, incrementar este valor es prioritario para la producción industrial de taxanos.

Bajo el punto de vista de la producción industrial, es más fácil y más rentable extraer un metabolito a partir del medio de cultivo que de una suspensión celular, por eso se tiende a generar condiciones que alteren las características de la membrana celular aumentando su permeabilidad. Cuando el producto perméa hacia la solución en función de un gradiente, puede desplazarse el gradiente en un sentido, mediante la utilización de resinas de cambio no iónicas que retiren el metabolito de la solución, desplazando el equilibrio hacia el exterior de la célula, Así en cultivos celulares de *T. cuspidate* la resina XAD-4 ha mostrado la mayor capacidad de adsorción para el taxol, incrementando la biosíntesis en un 40-70% **22**.

PRODUCCIÓN SEMIINDUSTRIAL

El paso del matraz al birreactor supone un cambio muy grande en las condiciones ambientales, lo que en muchos casos conlleva la disminución de la producción **11**. Hay que cuidar el inóculo inicial, la velocidad y tipo de agitación, la tasa de renovación del medio **26**. Cuando se pasa a planta piloto se plantean problemas de ingeniería que escapan a nuestro ámbito de estudio.

HONGOS ENDÓFITOS

El estudio de los hongos endófitos de *Taxus brevifolia*, no había producido hasta 1990 ningún aislamiento que pudiera relacionarse con el taxol. Sin embargo en 1993 se descubre en el Tejo del Pacífico un hongo *Taxomyces andreanae* capaz de producir Taxol **34**. Posteriormente se descubrió en *T. wallichiana* otro hongo *Pestalotiopsis microspora* que también era capaz de producir Taxol **23**. Pero lo que llamó la atención de este hongo era que también podía encontrarse como endófito en otras especies no pertenecientes al género *Taxus*, como en *Coryllus avellana L.* manteniendo la capacidad de producir taxol **2**. Parece que la distribución de estos hongos endófitos para producir taxol es universal y no se halla restringida a los tejos.

Se vio que había otros hongos endófitos capaces de producir Taxol, la justificación para esta amplia presencia de hongos endófitos productores de taxol se basa en las propiedades fungicidas de este compuesto, lo que permite a la planta evitar los ataques de *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp. que constituyen los fitopatógenos más importantes y que compiten con los hongos endófitos por el mismo nicho en las plantas. Hoy se postula que los hongos endófitos actúan como antifúngicos de los hongos patógenos mediante la producción de Taxol o Taxanos relacionados que protegen a la planta huésped de la degradación y enfermedad causada por los patógenos. El mecanismo de acción del Taxol en el proceso de defensa, se basa en la interacción con la tubulina de la célula del patógeno, de forma idéntica a como lo hacen en las células cancerígenas en división.

A pesar de los numerosos esfuerzos realizados por diversos laboratorios, de momento la obtención de Taxol o taxanos mediante el cultivo de hongos no ha sido posible de forma rentable, en el cultivo en suspensión se producen cantidades muy pequeñas, por debajo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, mucho menos que las obtenidas por las técnicas ya descritas de cultivos celulares. A mayor abundamiento, la capacidad de producir taxol por los hongos en cultivo se va atenuando con el tiempo, aunque cabe reactivarlos mediante la adición de ciertos compuestos activadores. Existen fundadas esperanzas en encontrar hongos endófitos que produzcan taxanos en mayores

cantidades y que sirvan de plataforma para la síntesis comercial de taxol u otros taxanos que puedan ser usados como punto de partida para la síntesis del propio Taxol o de otros compuestos.

EPÍLOGO

Hemos visto que el Taxol no es patrimonio exclusivo del género *Taxus* y que SE encuentran enormes diferencias inter e intraespecífica. Existen otros organismos capaces de producir Taxol y se abre así la posibilidad de recurrir a fuentes más accesibles **2**.

Se ha avanzado en el conocimiento de la ruta metabólica del Taxol. El esqueleto diterpenoide procede de la ruta del mevalonato y se aislaron e identificaron varias enzimas implicadas en su biosíntesis, así como los genes que las codifican, estos descubrimientos abren las puertas a la ingeniería genética y a la posibilidad de que microorganismos genéticamente modificados puedan ser fuente de Taxol. Se han modificado *Escherichia coli* y *Sacharomices cerevisiae* obteniéndose producciones de taxadieno muy superiores a las que se producen en, la también modificada *Arabidopsis thaliana* **3**. El cultivo microbiano presenta ventajas sobre el cultivo de suspensiones celulares por ser cultivos permanentes, más estables que las células vegetales, tienen capacidad de amplificar la producción existe la posibilidad de variar el producto, modificando las condiciones de cultivo. Sin embargo es este un campo que se sale del ámbito de estudio de la Fisiología Vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bentebibel S, Moyano E, Palazón J, Cusido, RM, Bonfill M, Eibl R, Piñol MT (2005) Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnol Bioengineer* 89: 647-655
2. Bestoso F, Ottaggio L, Damonte G, Degan P, Mazzei M, Cavalli F, Ledda B, Miele M. (2006) In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxones. *BMCBiotechnology* 6.
3. Besumbes O, Sauret-Guetom S, Phillips MA, Imperial S, Rodríguez-Concepción M, Boronat , (2004). Metabolic engineering of isoprenoid biosíntesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol. *Biotechnol Bioeng* 88: 168-175.
4. Bonfill M, PalazónJ, Cusido RM, Joly S, MoralesC, Piñol MT, (2003) Influence of elicitors on taxane production and 3-hydroxy-3-methylglutaril coenzyme A reductase activity in *Taxus media* cells. *Plant Physiol Biochem* 41: 91-96.
5. Bonfill M, Exposito O, Moyano E, Cusido RM, Palazón J, Piñol MT (2006) Manipulation by culture mixing and elicitation of paclitaxel and baccatin III production in *Taxus baccata* suspensión cultures. *In vitro Cellular Develop Biol-Plant*.42:422-426.
6. Bringi V, Kadkade PG, Prince CL, Schubmehl BF, Kane EJ, Roach B, (1995) Enhanced production of Taxol and taxanes by cell cultures of *Taxus* species. US Patent 5407816.
7. Canter PH, Thomas H, Ernst E (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnol*23: 180-185.
8. Chen WM(1990) Chemical constituents and physiological activity of *Taxus* spp. *Acta Pharma. Sinica* 25: 227-240.

9. Cidd V, Srinivasan V, Shyler ML. (1995) Elicitation of *Taxus* sp. Cell cultures for production of Taxol. *Biotechnol Lett.* 17: 1343-1346.
10. Cragg GM, Schepartz SA, Suffness M, Grever MR (1993). The taxol supply crisis. New NCI policies handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J Nat Prod* 56: 1657-1668. Chen WM(1990) Chemical constituents and physiological activity of *Taxus* spp. *Acta Pharma. Sinica* 25: 227-240.
11. Cusido RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales C, Piñol MT, (2002) Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. *Biotechnol Prog* 18: 418-423.
12. Cusido RM, Palazón J, Bonfill M, Exposito O, Moyano E, Piñol MT, (2007). Source of isopentenyl diphosphate for taxol and baccatin III biosynthesis in cell cultures of *Taxus baccata*. *Biochem Bioengineer J* 33: 159-167
13. Dong HD, Zhong JJ. (2002). Enhanced taxane production in bioreactor cultivation of *Taxus chinensis* cells by combining elicitation, sucrose feeding and ethylene incorporation. *Enzyme Microb. Technol* 31: 116-121.
14. Fett-Neto AG, Melanson SJ, Nicholson SA, Pennigton JJ, DiCosmo F. (1994a) Improved Taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Bioeng* 44: 967-971.
15. Fett-Neto AG, Zhane WV, DiCosmo F, (1994b). Kinetics of taxol production, growth and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol Bioeng* 44: 205-210.
16. Fowler FM, (1988) Problems in commercial exploitation of plant cell cultures. In: Application of plant cell and tissue culture. Ciba Foundation Symposium 137, John Wiley & Sons, Chichester pp 239-253.
17. Fujita Y, Takahashi S, Yamada Y, (1984), Selection of cell lines with high productivity of shikinin derivatives through protoplasts of *Lythospermum erythrorhizon*. *Proc 32d European Congress on Biotechnology, Vol 1* pp 161-166.
18. Gautheret RJ, (1934). Culture du tissues cambial. *C.R. Acad Sci* 198: 2195-2196

19. Holton RA, SomozaC, Kim HB, Liang F, BiedigerRJ, BoatmanPD, Shindo M, Smith CC, Kim S,NadizadehH, Suzuki Y, Tao C, Vu P, Tang S, Zhang P, Murthi KK, Gentile LN,Liu JH (1994) First total síntesis of taxol.1.FunctionALIZATION OF THE b RING. J Am Chem Soc 116: 1597-1600.
20. Ketchum REB, Gibson DM, (1996). Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*. Plant Cell Tissue Organ Cult 46:9-16.
21. Kim BJ, Gibson DM, Shuler ML (2004) Effect of subculture and elicitation on instability of Taxol production in *Taxus* sp suspension cultures. Biotechnology Progress 20: 1666-1673.
22. Kwon IC, Yoo YJ, Lee JH, Hyun JO. (1998) Enhancement of taxolproduction by *in situ* recovery of product. Process Biochem 33: 701-707.
23. Li J-Y, Sidhu RS, Bollon A, Strobel GA, (1998). Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. Mycol Res 102: 461-464.
24. Majada JP, Sierra M, Sánchez Tamés R, (2000). One step more towards taxan production through enhanced *Taxus* propagation. Plant Cell Rep 19: 825-830.
25. Nadeem M, Palni LMS, Purohit AN, Pandery H, Nandy SK, (2000). Propagation and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: an important medicinal herb. Biol Conserv 92: 121-129.
26. Navia-Osorio A, Garden H, Cusido RM, Palazon J, Alfermann AW, Piñol MT (2002) Taxol ® and baccatin III production in suspensión cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor. J Plant Physiol 159: 97-102
27. Nicolau KC, Yabg Z, Liu JJ, UenoH, NantermentPG, Guy RK, Claiborne CF, Renaud JCouladourosEA, PaulvannanK, Sorensen EJ, (1994). Total síntesis of taxol.Nature 367: 630-634.
28. Pestenchaker L, Roberts SC, Shuler ML. (1996) Kinetics of Taxol production and nutrient use in suspension cultures of *Taxus cuspidata* in shake flasks and Wilso-type bioreactor. Enzy,e Microb Tech 19: 256-260.
29. Rout GR, Samantaray S, Das P (2000). In vitro manipulation and propagation of

- medicinal plants. *Biotechnol Adv* 18: 91-120.
30. Sánchez Tamés R, Díaz A, Mateos F, Majada JP, Fal A, (1991) Sistema automático de cultivo *in vitro* de plantas con aplicación preferencial sobre las etapas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación de los explantos. PE 9101149.
 31. Sierra M, Majada JP, Sánchez Tamés R. (1998). Efecto de reguladores exógenos en la producción de taxanos. VI Simposio Metabolismo y modo de acción de fitohormonas, Oviedo, pp. 75-80.
 32. Sierra M, Sánchez Tamés R, (1994) Taxol production by *in vitro* culture of *Taxus baccata* L. VII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Firenze, Italy.
 33. Sierra MI, Sánchez Tamés R, (1995) Cultivo de callo y suspensiones celulares de *Taxus baccata* L.: Producción de taxanos. IX Reunión Nacional de la SEFV, IV Congreso Luso-Espanhol de Fisiología Vegetal. Estéril.
 34. Stierle A, Strobel G, (1995) The search for a taxol producing microorganism among the endophytic fungus of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*. *J Nat Products* 58: 1315-1324.
 35. Ulbrich B, Wiesner W, Arens H, (1985). Large scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In: Newmann KH, Barz W, Reinhard E, (Eds) Primary and secondary metabolism of Plant Cell Cultures. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
 36. Van Uden W, Homan B, Woerdenbag HJ, Pras N, Malingre TM, Wichers HJ, (1992). Isolation, purification and cytotoxicity of 5-methoxypodophyllotoxin, a lignan from a root culture of *Linum flavum* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 27: 115-121.
 37. Vanisree M, Lee CV, Lo SF, Nalawade SM, Lin CY, Tsay HS (2004). Studies on the production of some important metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sinica* 45: 1-22.
 38. Verpoorte R, Contin A, Memelink J, (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1: 13-25.
 39. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971) Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor

- agent from *Taxus brfevifolia*. J AmChem Soc 93: 2325-2327.
40. White PR, (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol 9: 585-600.
 41. Wickremesinhe, E.R.M. y Arteca, R.N. (1993) *Taxus* callus scultures. Initiation, growth, optimization, characterization and taxol production. Plant Cell Tissue Org Culture 35: 181-193.
 42. Wickremesinhe, E.R.M. y Arteca, R.N. (1994) *Taxus* cell suspensión cultures: optimization, growth and production of taxol. J Plant Physiol 144: 183-188.
 43. Wu J, Wang C, Mei X, (2001). Stimulation of Taxol production and excretion in *Taxus* spp. Cell cultures by rare earth chemical lanthanum. J Biotechnol 85:65-73.
 44. Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y, (1996), Methyl jasmonato-induced overproduction of Paclitaxel and baccatina III in *Taxus* cell suspension cultures. Nat. Biotechnol 14: 1129-1132.
 45. Yuan YJ, Hu GW, Wang CG, Jing Y, Zhoy YQ, Shen PW, (1998) Effect of rare earth compounds on the growth, Taxol biosynthesis and release in *Taxus cuspidata* cell culture, J Chin rare Earth Soc 16: 56-60.
 46. Zheng Z, Wu M (2004) Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metab olites in *Catharanthus roseus*. Plant Sc 166:507-514.
 47. Zhong J-J, (1995). Recent advances in cell cultures of *Taxus* spp. For production of the natural anticancer drug taxol. Plant Tissue CultBiotechnol 1: 75-80.