

Uso de hongos endófitos en la producción del fármaco anti-cáncer Taxol

Hebert Jair Barrales-Cureño^{1*}, Raqueline de la Rosa Montoya². *Autor para correspondencia.

¹Colegio de Postgraduados. km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP 56 230. e-mail: barrales.hebert@colpos.mx

²Laboratorio de biología molecular. Centro Internacional del Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT. km 45. Carretera México-Veracruz. El Batán, Texcoco, Estado de México, CP 56 130.

RESUMEN

El Taxol es un fármaco empleado en la quimioterapia del cáncer de seno, pulmón, ovario, próstata, hígado y en el tratamiento de la artritis reumatoide. El Taxol proviene de árboles de *Taxus* spp. Se encuentra en bajas concentraciones en la corteza, agujas y raíces. La producción se obtiene por síntesis química total, pero el proceso es muy costoso. La semisíntesis se obtiene a partir de precursores como 10-diacetilbaccatina y baccatina III pero presenta baja producción. Por otro lado, los procesos de cultivo *in vitro* de callos y células se perfilan como una buena estrategia pero con bajo rendimiento. Por lo tanto, es urgente generar la búsqueda de alternativas para la producción de este fármaco debido a la creciente demanda del Taxol y la escasez del recurso vegetal. La forma más promisoría a gran escala de producción de Taxol es mediante el uso de sistemas de fermentación de hongos *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue presentar una revisión de la literatura científica actualizada sobre el uso de hongos endófitos en la producción de este compuesto anticancerígeno. Incluye la definición de los taxoides, el mecanismo de acción biológica específica del Taxol sobre las células cancerosas, las enzimas involucradas en la biosíntesis del Taxol, los métodos cuantitativos de detección de Taxol a partir de cultivo de hongos y la alternativa biotecnológica para la producción de Taxol mediante la biodisponibilidad de hongos endófitos de gran importancia biológica a partir de *Taxus* spp.

Palabras clave: apoptosis, biosíntesis, 10 diacetil baccatina III, taxoides, Taxol fúngico

Use of endophytic fungi in the Taxol anticancer drug production

ABSTRACT

Taxol is a drug used in the chemotherapy of breast, lung, ovarian, prostate, liver cancers, and in the treatment of rheumatoid arthritis. Taxol is obtained from *Taxus* spp. trees. It is found in low concentrations in the bark, needles and roots. The production is obtained by total chemical synthesis, but the process is very costly. The semi-synthesis is obtained from precursors like 10-diacetyl baccatina and baccatin III but has low production. On the other hand, the processes of *in vitro* culture of callus and cells are seen as a good strategy but in low yield. Therefore, it is urgent to find alternatives for the production of this drug due to the growing demand of Taxol and plant resource scarcity. The most promising way to large scale production of taxol is using *in vitro* fungi fermentation systems. The aim of this study was to present a review of the updated information in the scientific literature about the use of endophytic fungi in the production of this anticancer compound. We includes the definition of taxoids, the specific mechanism of biological action of Taxol on cancer cells, the enzyme involved in the biosynthesis of Taxol, quantitative methods for detection of taxol from fungi culture and the biotechnological alternative for Taxol production by bioavailability of endophytes of great biological importance from *Taxus* spp.

Key words: apoptosis, biosynthesis, 10-deacetyl baccatin III, fungal Taxol, toxoids

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

TAXOL

Características del Taxol y taxotere

Mecanismo de acción biológico del Taxol

Biosíntesis del Taxol y compuestos análogos

TAXOL FÚNGICO

Relación hongo endófito-planta hospedera
 Producción de Taxol en hongos endófitos
 Condiciones del cultivo para hongos endófitos productores de Taxol
 Métodos de detección de Taxol a partir de cultivos de hongos endófitos
 Efecto citotóxico de Taxol fúngico sobre líneas celulares de cáncer

CONCLUSIONES

INTRODUCCIÓN

El Taxol es un fármaco anti-cáncer diterpénico proveniente de la corteza de árboles del tejo (*Taxus* spp.). El potencial de venta anualmente en el mercado farmacéutico es de más de 2 billones de dólares (Han *et al.*, 2007). El Taxol se encuentra en bajas concentraciones en las agujas, corteza, y raíces de *Taxus* spp. (Gangadevi *et al.*, 2008). Por ejemplo, se necesitan 13 500 kg de corteza de 3 000 árboles de *T. brevifolia* (tejo del Pacífico, la especie más productora) para obtener alrededor de 1 kg de Taxol (Xiong *et al.*, 2013) y se requieren 2 g de Taxol para un completo régimen de tratamiento antitumoral durante varios meses en un paciente con cáncer (Nomila *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2013).

El cáncer es una enfermedad genética celular, debido a que no responde al control normal de la mitosis, genera una progenie que hereda la cualidad de dividirse continuamente. La lesión ocurre en el genoma, y por ello se transmite a las células descendientes y a todo el organismo, proceso conocido como metástasis (Barrales *et al.*, 2012). El Taxol presenta un amplio espectro de actividad frente a tumores sólidos y ha sido aprobado en numerosos países y prescrito mayoritariamente para distintos tipos de cáncer como: de colon (Singla *et al.*, 2002), sarcoma de Kaposi relacionado con el VIH (Brown, 2003), artritis reumatoide, malaria, enfermedad de Alzheimer, enfermedad del riñón policístico dominante autosomal (Sreekanth *et al.*, 2011), cáncer cervical, gástrico (Weng-Juan *et al.*, 2011), próstata, carcinoma de cuello (Zhang *et al.*, 2012), carcinoma de cabeza (Nejatpour *et al.*, 2012), leucopenia, cáncer de hígado (Priyadarshini *et al.*, 2012) y seno, pulmón, (Senthilkumar *et al.*, 2013), ovario (Wang *et al.*, 2013).

La demanda actual de Taxol es de 250 kg por año (Nomila *et al.*, 2012). Por lo tanto, es urgente y deseable generar la búsqueda de fuentes alternativas para la producción de este fármaco debido a la creciente demanda del

Taxol y escasez del recurso vegetal. La producción de Taxol se obtiene por métodos alternativos, por ejemplo: la síntesis química total o la purificación de los compuestos activos de *Taxus*, aunque es un proceso caro y complicado (Guo *et al.*, 2006); la semisíntesis del Taxol a partir de precursores como 10-diacetilbaccatina III o baccatina III, los cuales se aíslan a partir de las agujas, fuente renovable de los árboles, pero con baja producción (Jennewein *et al.*, 2004). Otra alternativa son los procesos de cultivo *in vitro* de callos y células en suspensión de *Taxus*, cuya ventaja es su independencia de los factores geográficos y climáticos (Hu *et al.*, 2003; Barrales *et al.*, 2010).

Los cultivos *in vitro* han sido recientemente aprobados por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) para el suministro de Taxol y, aunque se perfilan como una buena estrategia, los costos de la infraestructura son demasiado elevados y presentan la desventaja del bajo rendimiento. Sin embargo, la forma más prometedora a gran escala de producción de Taxol y taxoides relacionados es el uso de sistemas de fermentación de hongos *in vitro* (Xu *et al.*, 2006; De Jong *et al.*, 2006). La desventaja de producir Taxol fúngico en cultivos *in vitro* se ve limitado porque se atenúa con el tiempo, aunque está la posibilidad de reactivarlos mediante la adición de elicitores de tipo biótico o abiótico.

Los hongos endófitos son de gran importancia en la biotecnología como productores de compuestos farmacéuticos, metabolitos secundarios, agentes de control biológico y otras características útiles (Gangadevi *et al.*, 2008). Los endófitos son microorganismos (hongos o bacterias) que viven en una planta sin causar síntomas de enfermedad al hospedante (Stone *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2008). *Taxomyces andreanae* fue la primera especie de un hongo endófito productor de Taxol a partir del Tejo del Pacífico informada en la literatura científica (Stierle *et al.*, 1993). Todo esto

evidencia a los hongos y bacterias como una fuente potencial y uno de los principales medios para la obtención y el suministro de Taxol. Por lo tanto, los procesos de fermentación que utilizan microorganismos productores de Taxol puede ser una alternativa biotecnológica promisoría para producir este compuesto.

Teniendo en cuenta los aspectos anteriores y la importancia de la obtención de Taxol, el objetivo de este trabajo estuvo dirigido a presentar una revisión de la literatura científica actualizada sobre el uso de hongos endófitos en la producción de este compuesto anticancerígeno. Incluye la definición de los taxoides, el mecanismo de acción biológica específica del Taxol sobre las células cancerosas, las enzimas involucradas en la biosíntesis del Taxol, los métodos cuantitativos de detección de Taxol a partir de cultivo de hongos y la alternativa biotecnológica para la producción de Taxol mediante la biodisponibilidad de hongos endófitos de gran importancia biológica a partir de *Taxus* spp.

TAXOL

Características del Taxol y taxotere

Han sido referidos cerca de 400 taxoides de varias especies de *Taxus* (Barrales y Soto, 2012). La estructura del Taxol se determinó

por Wani *et al.* (1971) del *Research Triangle Institute* de EE.UU., como un diterpeno alcaloidal (fórmula molecular: $C_{47}H_{51}NO_{14}$, Figura 1), con un esqueleto de taxano altamente funcionalizado (Barrales y Soto, 2012).

El proceso comenzó con el fraccionamiento de los extractos con diferentes solventes. Las pruebas de citotoxicidad directa se realizan en ensayos guiados de líneas celulares. Los taxoides varían de acuerdo con la posición de los grupos funcionales, las hidroxilaciones se llevan a cabo por citocromos P450 monooxigenasas y los componentes de la cadena lateral son modificados por el esqueleto de taxano tricíclico (Barrales *et al.*, 2011).

El nombre genérico del Taxol es Paclitaxel, mientras que el nombre o marca comercial es Taxol®. El taxotere es un fármaco semisintético anticáncer que es utilizado en tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado y cáncer avanzado de estómago, no es muy recomendable su uso debido a que puede originar efectos secundarios tales como neutropenia (disminución de glóbulos blancos), retención de líquidos, reacciones alérgicas, vómitos y náuseas. El nombre genérico del taxotere es docetaxel (Barrales y Soto, 2011). Tanto el Taxol como el taxotere se administran vía inyección o infusión intravenosa.

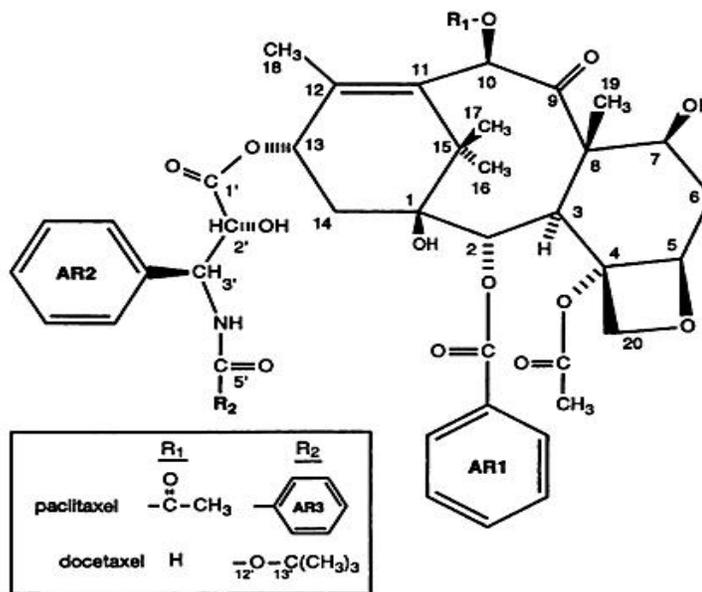


Figura 1. Estructura química del taxol. Modificado de: Nicolaou y Valiulin (2013).

Mecanismo de acción biológico del Taxol

El Taxol promueve el ensamblaje de α -tubulina en los microtúbulos por unión preferencial a la tubulina ensamblada más que a la tubulina no ensamblada. Su efecto está relacionado con el del nucleótido guanosín trifosfato (GTP), con importantes diferencias. El GTP se une a un extremo del dímero de tubulina haciendo contacto con el siguiente dímero a lo largo de cada protofilamento que forma el microtúbulo, mientras el Taxol se une a un lado de β -tubulina cerca del contacto con el siguiente protofilamento; en la α -tubulina, la zona correspondiente a la cavidad de unión a Taxol está ocupada por un bucle de la cadena peptídica (Nogales, 2000).

Los dímeros de tubulina sin ensamblar unen GTP y el sitio de unión queda ocluido por el ensamblaje, mientras el sitio de unión a Taxol existe sólo en la tubulina ensamblada (Jordan y Wilson, 1998). La hidrólisis de GTP permite el desensamblaje y la regulación del sistema de microtúbulos, sin embargo, la activación de la tubulina por Taxol es permanente, estabilizando los microtúbulos.

La supresión de la dinámica de microtúbulos celular por Taxol es una causa principal de la inhibición de la división celular y de la muerte de las células tumorales (Jordan y Wilson, 1998).

El Taxol induce el arresto del ciclo celular e incrementa los factores de señalización (Spencer y Faulds, 1994). Además, disminuye los niveles de glucosa 1,6-bifosfato, fructosa 1,6-bifosfato y ATP en la glicólisis, mediante mecanismos específicos, al inducir una separación de la fosfofructoquinasa del citoesqueleto de células del melanoma humano (Priyadarshini *et al.*, 2012).

Diferentes tipos de cáncer se combaten mediante tratamiento con Taxol (Singla *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2012; Senthilkumar *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Otros usos médicos son en el tratamiento de la artritis reumatoide, malaria, enfermedad de Alzheimer y enfermedad del riñón policístico dominante autosomal (Sreekanth *et al.*, 2011).

En este sentido, en un estudio biodirigido, el uso de una formulación de Taxol basada en policarbofilo tiolado mostró que los niveles de Taxol en el plasma mejoraron significativamente y se redujo el crecimiento de los tumores malignos (Föger *et al.*, 2008).

Biosíntesis del Taxol y compuestos análogos

Muchos pasos de la ruta de biosíntesis se han elucidado por medio del aislamiento de genes y enzimas de tejidos y cultivo *in vitro* de células en suspensión de *Taxus*. Usando herramientas moleculares, se han identificado los genes que codifican las enzima GGPP sintasa, 10 diacetil baccatina III-10-Oacetil transferasa, taxadieno sintasa, citocromo P450 taxano 10 β -hidroxilasa, 3'-N-dibenzoil-2'-dioxiTaxol N-benzoiltransferasa, baccatina III: 3-amino-3-fenilpropanoil transferasa, taxano 13 α -hidroxilasa, taxano 2 α -O-benzoiltransferasa y taxa-4(20),11(12)-dieno-5 α -ol-Oacetil transferasa (Walker *et al.*, 2000; Lenka *et al.*, 2012).

El primer paso en la biosíntesis de Taxol es la ciclización de geranylgeranyl difosfato (GGPP), el cual comienza con la formación de taxa-(4,5), (11,12)-dieno, que es el primer compuesto en la ruta biosintética del Taxol (Figura 2).

Esta reacción se cataliza por la enzima taxadieno sintasa (TS, una enzima formada por una proteína monomérica de 79 kDa con propiedades similares a otras ciclasas de terpenoides) (Barrales y Soto, 2012).

La enzima TS fue purificada y caracterizada por Hezari, Lewis y Croteau. Los genes que codifican para la taxadieno sintasa fueron identificados y clonados por Wildung y Croteau (Barrales y Soto, 2012).

La estructura genómica de TS se presenta en la figura 3-A. Análisis posteriores de la estructura enzimática revelaron características típicas de sintasa de terpenoides de plantas, tales como un motivo DDXXD responsable de la unión del cofactor, un dominio de la secuencia interna diterpeno de conífera y una hidrolasa como dominio glicosil (Trapp y Croteau, 2001, Fig. 3-B). Para una revisión más detallada de la biosíntesis del Taxol y taxoides relacionados consultar: Barrales y Soto (2012).

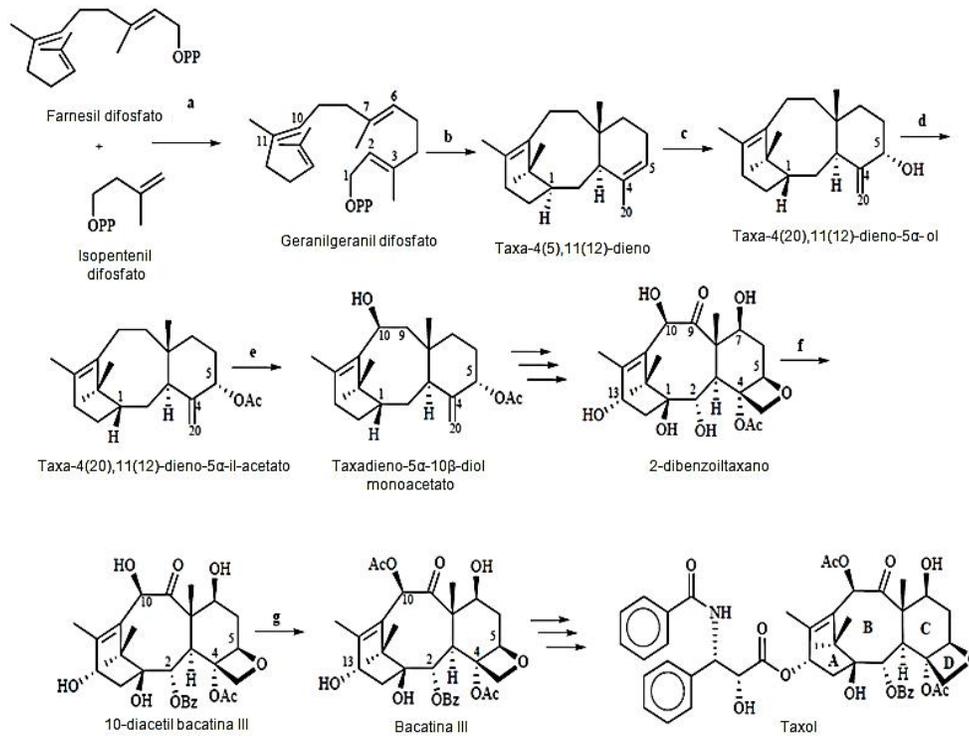


Figura 2. Esquema de la ruta de biosíntesis de taxol en *Taxus* spp. Las enzimas involucradas son geranylgeranil difosfato (a), taxadieno sintasa (b), citocromo P450 taxadieno 5α-hidroxilasa (c), taxa-4(20),11(12)-diene-5α-ol-O-acetiltransferasa (d), citocromo P450 taxano 10β-hidroxilasa (e), taxano 2α-O-benzoiltransferasa (f), 10-diacetil baccatina III-10-O-acetiltransferasa (g) y pasos indefinidos múltiples (se indica en múltiples flechas). Modificado de: Walker y Croteau (2001).

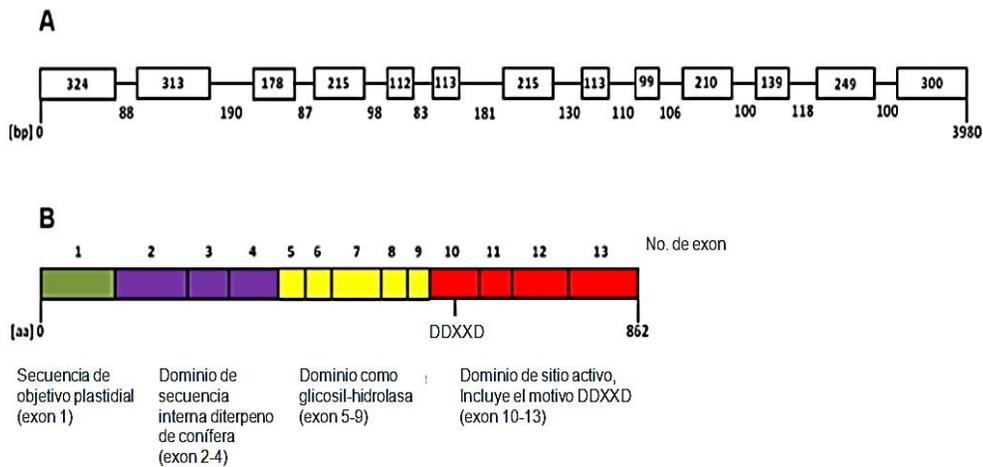


Figura 3. Estructura genómica y esquema de la estructura enzimática de taxadieno sintasa. A. Estructura genómica de taxadieno sintasa de *Taxus baccata* consistente de 13 exones (cajas) y 12 intrones (líneas); los números representan la longitud de los fragmentos en pares de bases (bp) B. Esquema de la estructura enzimática incluyendo la secuencia plastidial y las características principales de los motivos de terpeno sintasa, exones numerados (cajas) e intrones (líneas verticales) Tomado de: Trapp y Croteau (2001).

TAXOL FÚNGICO

Relación hongo endófito-planta hospedera

Los hongos endófitos se definen como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño evidente. Son un grupo muy diverso y polifilético que habitan en diversas partes de las plantas. La mayoría pertenecen al phylum *Ascomycota*, aunque también se han encontrado en *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Oomycota*. La relación entre los hongos endófitos y su planta hospedera va desde el mutualismo hasta la patogénesis (Rodríguez *et al.*, 2009). En estas relaciones ambos organismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos.

El hongo endófito produce factores de virulencia, como metabolitos fitotóxicos y exoenzimas, mientras que la planta produce sustancias involucradas en mecanismos de defensas, tanto bioquímicos como mecánicos (Schulz y Boyle, 2005).

En consecuencia, para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado, que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, las cuales varían y son influenciadas por la etapa de desarrollo de ambos organismos y por los factores ambientales. Cuando los factores de virulencia del hongo y las defensas de la planta están en equilibrio se establece una relación endofítica y, por el contrario, cuando se presenta la senescencia del hospedero o se encuentra bajo estrés, el balance se torna a favor del hongo y éste se expresa como patógeno, y se presentan síntomas de enfermedad (Kusari *et al.*, 2012).

Producción de Taxol en hongos endófitos

El Taxol es un metabolito secundario en *Taxus* spp., y sirve como una medida de protección o mecanismo de defensa del árbol de tipo fungicida contra el ataque de hongos ficomicetos tales como *Pythium* y *Phytophthora*, los cuales causan grandes problemas fitopatológicos en las raíces de algunas especies de plantas y compiten con los hongos endófitos por el mismo nicho ecológico (Li *et al.*, 1996). También los hongos endófitos pueden producir compuestos activos benéficos durante la simbiosis con plantas hospedantes (Sun *et al.*, 2008).

El Taxol y compuestos análogos han sido aislados a partir de *T. chinensis*, *T. cuspidata*, *T. media*, *T. mairei* y *T. baccata* (Jorgeane *et al.*, 2011). Entre los hongos endófitos que se destacan son: *Alternaria*, *Fusarium*, *Monochaetia*, *Periconia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Pithomyces*, *Taxomyces andreanae*, entre otros (Strobel, 2003).

El rendimiento de Taxol en cultivos *in vitro* de hongos endófitos varía de 24 a 70 ng l⁻¹ en el medio de cultivo (Stierle *et al.*, 1993; Strobel *et al.*, 1996). Varios hongos endófitos producen Taxol y compuestos análogos tales como: baccatina III y 10 diacetil baccatina III (Jorgeane *et al.*, 2011, Rahimi *et al.*, 2013) (Figura 4).

Shrestha *et al.* (2001) indicaron la producción de Taxol a partir de tres diferentes hongos endófitos aislados del Tejo del Himalaya (*T. wallichiana*) los cuales son: *Trichothecium* sp., *Sporormia minima* y hongos dimórficos sin identificar los que fueron confirmados por diferentes métodos analíticos y de inmunoensayo (Gangadevi y Muthumary, 2007). En la tabla 1 se indican los hongos endófitos productores del fármaco Taxol.

Las concentraciones de Taxol producidas por los hongos endófitos varían de acuerdo con el género y especie fúngica así como con la especie vegetal.

Por ejemplo, el hongo endófito *Fusarium mairei* aislado del árbol asiático *T. cuspidata* tiene la mayor producción de Taxol con 6.11 mg l⁻¹ y *Gliocladium* sp. la menor con 1 076 ng/200 ml. Por otra parte, el hongo endófito *Stemphylium sedicola* aislado del árbol europeo *T. baccata* tiene la mayor producción de Taxol con 6.9 ± 0.2 µg l⁻¹ y *Nodulisporium sylviforme* la menor con 0.051 a 0.01257 µg l⁻¹. *Pestalotiopsis microspora* aislado del árbol asiático *T. wallichiana* presenta una producción de 60 a 70 µg l⁻¹ mientras que *Fusarium mairei* aislado en China del árbol *T. chinensis* var. *mairei* produce 20 µg l⁻¹. Igualmente, *Didymostilbe* sp. aislado en China del árbol *T. chinensis* muestra una producción de 8 a 15 µg l⁻¹. Otra especie fúngica, *Taxomyces andreanae* aislado a partir del árbol de América del Norte *T. brevifolia*, produce de 0.024 a 0.025 µg l⁻¹ de Taxol. Autores como Noh *et al.* (1999) informaron que a partir del suelo de bosque de tejos un hongo endófito, *Pestalotia heterocornis*, produce 0.031 µg l⁻¹ de Taxol.

Sun *et al.* (2008) aislaron 155 cepas de hongos endófitos a partir de tejidos de *Podocarpus*. Los resultados mostraron que la cepa ETPT-1, clasificada como *Aspergillus fumigatus* puede ser un candidato para la producción de Taxol. También se ha obtenido Taxol de cepas de hongos endófitos de la especie *Botryodiplodia theobromae* (Raja *et al.*, 2008) y de cepas aisladas de hojas de *Taxus baccata*, así como de *Phyllosticta citricarpa* de *Citrus medica* (Senthil *et al.*, 2008). De igual forma se ha referido que *Pestalotiopsis terminaliae* aislado de la planta *Terminalia arjuna* (Gangadevi y Muthumary, 2009) produce la mayor cantidad de Taxol. En estudios posteriores, se encontraron otras especies de microorganismos aislados de coníferas capaces de producir Taxol tales como *Periconia* sp., *Fusarium solani*, *Alternaria* sp. y *Aspergillus* sp. (Sun *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009), lo cual es interesante debido a que proceden de árboles de diferentes géneros y familias (Visalakchi y Muthumary, 2010).

El origen genético de la producción de Taxol fúngico se especula que se realiza mediante la transferencia horizontal de genes de la planta hospedera a sus endófitos aunque existe poca información respecto a la transferencia de genes de una planta superior a un endófito o parásito (Visalakchi y Muthumary, 2010).

Condiciones del cultivo para hongos endófitos productores de Taxol

Algunos medios de cultivo utilizados para el crecimiento fúngico son: PDA (papa-dextrosa-agar), OMA (agar harina de avena), CMA (agar harina de maíz) y el jugo V-8 (Sreekanth *et al.*, 2011). Las características que se analizan son: temperatura óptima de crecimiento, presencia o ausencia de conidios, morfología de conidios, características de los conidióforos, color de la colonia, características morfológicas de la colonia, diámetro promedio (mm) de las colonias después de 5 días (Sreekanth *et al.*, 2011), entre otras.

Métodos de detección de Taxol a partir de cultivos de hongos endófitos

Los métodos utilizados para la cuantificación de Taxol en extractos fúngicos son: CL-MS (Guo *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008), análisis espectroscópico por luz UV (Gangadevi *et al.*,

2008), RP-HPLC (Barrales *et al.*, 2011), cromatografía en capa fina de alta resolución, HPTLC (Barrales *et al.*, 2011), IR, TLC (Nomila *et al.*, 2012), espectroscopía de masas (SM) (Soliman y Raizada, 2013), ¹H NMR (Soliman y Raizada, 2013), inmunoensayo mediante reconocimiento de un anticuerpo monoclonal de Taxol (Soliman y Raizada, 2013), LC-ESI-MS y MALDI.

El inmunoensayo de Taxol por inhibición competitiva, utiliza anticuerpos monoclonales anti-Taxol. El inmunoensayo detecta valores superiores a 3.5 ng ml⁻¹, es insensible a compuestos análogos tales como la cefalomanina en niveles inferiores a 60 ng ml⁻¹ e insensible a baccatina III y 10-diacetil baccatina III por debajo de 1000 ng ml⁻¹. El Taxol de la muestra se detecta por la inhibición competitiva que éste ejerce sobre la reacción entre el antígeno, Taxol-proteína conjugada de la fase sólida y el anticuerpo anti-Taxol. El grado de inhibición, comparado con los controles desinhibidos, se observa por la intensidad de color que resulta de la adición de anti-anti-Taxol-fosfatasa alcalina conjugada y su sustrato. Diversos factores pueden afectar la reacción inmunoquímica en cada pozo de reacción, por ejemplo, las condiciones físicas externas, como la temperatura, variación en los procedimientos experimentales, diferencias en las adsorptividades de diferentes placas y en diferentes pozos de la misma placa, así como variaciones entre los reactivos estándar entre lote y lote de reactivos (Grothaus *et al.*, 1993).

Los taxoides se detectan, además, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) a una longitud de onda de 227 nm. La fase móvil utilizada consiste de metanol/acetoneitrilo/agua (20:33:47 por volumen). La columna que se utiliza para el análisis es C₁₈, tamaño de partícula 5 µm y una longitud 150 mm. La tasa de elución es de 1 ml min⁻¹. Se debe comparar con estándares del taxoide analizado (Zhang *et al.*, 2011).

Los sistemas de solventes eficientes que se utilizan en cromatografía en capa fina para identificar cualitativamente la presencia de Taxol son: a) cloroformo/metanol (7:1 v/v), b) cloroformo/acetoneitrilo (7:3 v/v), c) acetato de etilo/2-propanol (95.55 v/v) y d) cloruro de metileno/metanol/dimetilformamida (90:9:1 v/v/v).

La presencia de Taxol se detecta fácilmente con una solución al 1% (m/v) del reactivo de vainilla/ácido sulfúrico después de un suave calentamiento. La apariencia de una mancha azulada desvanecida a gris oscuro después de 24 h es indicativa de la presencia de Taxol (Gangadevi y Muthumary, 2007).

Los métodos de identificación molecular que se utilizan para confirmar la identidad de los hongos endófitos son: análisis de secuencias de rRNA 18S (Zhou *et al.*, 2009), región del espacio transcrito interno, análisis de secuencias de rDNA 26S y análisis de secuencias conservadas ITS4-ITS5.

Efecto citotóxico de Taxol fúngico sobre líneas celulares de cáncer

Existe amplia evidencia sobre la inducción de la apoptosis en diversas células cancerosas tratadas con Taxol, tales como cáncer de mama, glioblastoma, hepatoma y cáncer de ovario. El Taxol es conocido por activar la apoptosis en las vías dependientes e independientes de caspasa (Bröker *et al.*, 2004; Piñeiro *et al.*, 2007).

Gangadevi y Muthumary (2007) evaluaron el efecto de la citotoxicidad de Taxol fúngico aislado de hongos endófitos sobre líneas celulares de cáncer utilizando el método de apoptosis, en un rango de concentraciones de 0.005 a 5 μM de Taxol fúngico. Los resultados indicaron que las concentraciones 0.05 y 0.5 μM de Taxol obtenido del filtrado fúngico mostró que muchas de las células fueron arrestadas durante la división celular y el núcleo celular comenzó a condensarse y a segmentarse después de 24 h de incubación, lo cual es indicio de muerte celular por apoptosis.

De igual forma, las concentraciones de 0.05 y 0.5 μM aplicadas sobre cinco líneas celulares ocasionaron altos porcentajes de células apoptóticas: BT220-seno (79.6 a 81.6%), HII6-colon humano (70.6 a 78.5%), Int407-intestino humano (70.6 a 79.8%), HL251-pulmón humano (69.3 a 72.5) y HLK210-leucemia humana (68.6 a 79.6%). Las células apoptóticas son fácilmente visibles en tejidos en desarrollo y en tumores y se encuentran a bajas tasas en tejidos adultos (Gangadevi y Muthumary, 2007). Por lo tanto, se evidenció

que la eficacia del Taxol fúngico de diferentes especies de hongos endófitos fue totalmente dependiente del tipo específico de células.

La secuencia de los cambios sobre la morfología celular por medio de la apoptosis se resume a continuación: 1) disminución celular, 2) condensación, marginación y fragmentación de la cromatina, 3) retención de la estructura de los organelos citoplasmáticos y pérdida de las interrelaciones de las posiciones de los organelos (Wyllie, 1992).

CONCLUSIONES

Los procesos de fermentación utilizando microorganismos son uno de los mejores métodos de elección por su bajo costo y el incremento de rendimientos de metabolitos naturales. La población endófito explorada de *Taxus* spp. representa una gran variedad de géneros de hongos y variación en la producción de Taxol. Los hongos endófitos que pueden ser utilizados para la producción de Taxol a gran escala a nivel industrial son: *Fusarium mairei*, *Stemphylium sedicola* y *Pestalotiopsis microspora*. Los procesos de fermentación con el uso de microorganismos productores de Taxol puede ser una alternativa conducente para producir Taxol. Las ventajas potenciales de la producción de Taxol microbiano incluyen: un rápido crecimiento del cultivo, condiciones de cultivo reproducible, alta densidad celular, fácil manipulación genética y la posibilidad de escala a nivel industrial de la producción del compuesto. Además, la producción microbiana ayuda a proteger los recursos naturales de extinción de los árboles de *Taxus* spp. para evitar hacer peligrar las especies. La desventaja de producir Taxol fúngico en cultivos *in vitro* se ve limitado porque se atenúa con el tiempo, aunque está la posibilidad de reactivarlos mediante la adición de elicitores de tipo biótico o abiótico. Los hongos endófitos pueden ser manipulados y perfilados para incrementar la producción de Taxol por medio de la ingeniería genética para comprender la forma de transformación del material genético entre la asociación del endófito y el hospedante. Se recomienda identificar la producción de Taxol en una mayor exploración de hongos endófitos de especies faltantes de *Taxus* o a partir de otras especies vegetales.

REFERENCIAS

- Barrales, CHJ, De la Rosa MR, Villegas OS (2012) Hacia una genética celular del cáncer. *Revista la Ciencia y el Hombre* 25: 1-6
- Barrales, CHJ, Soto HRM (2012) Taxoides: metabolitos secundarios del árbol del tejo (*Taxus* spp.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18: 207-218
- Barrales, CHJ, Soto HRM (2011) Bioquímica de los taxoides utilizados contra el cáncer. *Revista de Educación Bioquímica* 30: 12-20
- Barrales, CHJ, Soto HRM, Ramos VAC, Trejo TLI, Martínez VM, Ramírez GME, López UJ (2011) Extracción y cuantificación de taxoides por HPLC en hojas *in situ* y en callos inducidos *in vitro* de *Taxus globosa* Schlecht. *Spanish Journal of Rural Development* 2: 103-114
- Bröker, LE, Huisman C, Span SW, Rodriguez JA, Kruyt FA, Giaccone G (2004) Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Research* 64(1): 27-30
- Chakravarthi, BVSK, Das P, Surendranath K, Karande AA, Jayabaskaran C (2008) Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *Journal of Biosciences* 33: 259-267
- Chakravarthi, BVSK, Sujay R, Kuriakose GC, Karande AA, Jayabaskaran C (2013) Inhibition of cancer cell proliferation and apoptosis-inducing activity of fungal Taxol and its precursor baccatin III purified from endophytic *Fusarium solani*. *Cancer Cell International* 13: 105-115
- DeJong, J, Liu Y, Bollon A, Long R, Jennewein S, Williams D, Croteau R (2006) Genetic engineering of Taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 93: 212-224
- Föger, F, Malaivijitnond S, Wannaprasert T, Huck C, Bernkop-Schnür A, Werle M (2008) Effect of a thiolated polymer on oral paclitaxel absorption and tumor growth in rats. *Journal of Drug Targeting* 16: 149-155
- Gangadevi, V, Murugan M, Muthumary J (2008) Taxol Determination from *Pestalotiopsis paucisetata*, a Fungal Endophyte of a Medicinal Plant Chinese. *Journal of Biotechnology* 24: 1433-1438
- Gangadevi, V, Muthumary J (2007) Preliminary studies on cytotoxic effect of fungal Taxol on cancer cell lines. *African Journal of Biotechnology* 6: 1382-1386
- Gangadevi, V, Muthumary J (2009) Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 52: 9-15
- Guo, BH, Kai GY, Jin HB, Tang KX (2006) Taxol synthesis. *African Journal of Biotechnology* 5: 15-20
- Han, J, Li Z, Liu B, Wang H, Li G, Ye H (2007) Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 23: 561-569
- Hu, YM, Gan FY, Lu CH, Ding HS, Shen YM (2003) Production of Taxol and related taxanes by cell suspension culture of *Taxus yunnanensis*. *Acta Botanica Sinica* 45: 373-378
- Jennewein, S, Wildung MR, 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 of the United States*
- Jordan, MA, Wilson L (1998) Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current Opinion in Cell Biology* 10: 123-130
- Jorgeanek, SJ, Curcino VIJ, Rodrigues FE, Braz FR (2011) Terpenoids from Endophytic Fungi. *Molecules* 16: 10604-10618
- Kumaran, RS, BK Hur (2009) Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug Taxol. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 54: 21-30
- Kusari, S, Hertweck C, Spiteller M (2012) Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chem. & Biol.* 19: 792-798
- Lenka, KS, Boutaoui N, Paulose B, Vongpaseuth K, Normanly J, Roberts CS, Walker LE (2012) Identification and expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing *Taxus cuspidate* suspension culture cells. *BMC Genomics* 13: 148-157
- Li, CT, Li Y, Wang QJ, Sung CK (2008) Taxol production by *Fusarium arthrosporioides* isolated from yew, *Taxus cuspidate*. *Journal of Molecular Biology* 27: 454-458
- Li, JY, Strobel G, Sidhu R, Hess WM, Ford EJ (1996) Endophytic Taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology* 142: 2223-2226
- Li, YC, Tao WY (2009) Interactions of Taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus* spp.) during Taxol accumulation. *Cell Biology International* 33: 106-112

- Liu, GZ, Zhao KH, Li YX, Deng JH, Peng BWH (2009) Isolation, identification of an endophytic taxol-producing fungus obtained from *Taxus chinensis*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 36: 1171-1177
- Liu, L, Liu S, Chen X, Guo L, Che Y (2009) Pestalofones A-E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsisfici*. Bioorg. Med. Chem. 17: 606-613
- Miller, K, Neilan B, Sze MYD (2008) Development of Taxol and Other Endophyte Produced Anti-Cancer Agents. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery 3: 14-19
- Mirjalili, MH, Farzaneh M, Bonfill M, Rezadoost H, Ghassempour A (2012) Isolation and characterization of *Stemphylium sedicola* SBU-16 as a new endophytic Taxol-producing fungus from *Taxus baccata* grown in Iran. FEMS Microbiology Letters 328: 122-129
- Nejatpour, M, Bayat Z, Mahdizadeh SJ (2011) New two carrier-Taxol as drug delivery system: A computational chemistry study. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 3: 249-252
- Nicolaou, KC, Valiulin RA (2013) Synthesis and biological evaluation of new paclitaxel analogs and discovery of potent antitumor agents. Organic & Biomolecular Chemistry 11: 4154-4163
- Nogales, E (2000) Structural insights into microtubule function. Annual Review of Biochemistry 69: 277-302
- Nomila, MJ, Nimal CIVS, Kumar PP, Kumar M, Agastian P (2012) Taxol production by endophytic *Fusarium solani* LCPANCF01 from *Tylophora indica*. Journal of Academia and Industrial Research 1: 281-285
- Piñeiro, D, Martín ME, Guerra N, Salinas M, González VM (2007) Calpain inhibition stimulates caspase-dependent apoptosis induced by Taxol in NIH3T3 cells. Experimental Cell Research 313: 369-379
- Priyadarshini, K, Aparajitha KU (2012) Paclitaxel against cancer: a short review. Medicinal Chemistry 2: 139-141
- Qiao, WJ, Cheng HY, Li CQ, Jin H, Yang SS, Li X, Zhang YY (2011) Identification of pathways involved in paclitaxel activity in cervical cancer. Asian Pacific journal of cancer prevention 12: 99-102
- Rahimi, N, Nazeri S, Mirzaei S (2013) Taxol production by endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*. Arak Medical University Journal 16: 37-44
- Raja, V, Kamalraj S, Muthumary J (2008) Taxol from *Botryodiplodia theobromae* (BT 115)-An endophytic fungus of *Taxus baccata*. Journal of Biotechnology 136: 187-197
- Rodríguez, R, White J, Arnold AE, Redman R (2009) Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. New Phytol. 182: 314-330
- Schulz, B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. Mycol. Res. 109:661-686
- Senthil, KR, Muthumary J, Hur BK (2008) Taxol from *Phyllosticta citricarpa*, a leaf spot fungus of the angiosperm *Citrus medica*. Journal of BioScience and BioEngineering 106: 103-106
- Senthilkumar, N, Murugesan S, Mohan V, Muthumary J (2013) Taxol producing fungal endophyte, *Calletotrichum gleosporoides* (Penz.) from *Tectona grandis* L. Current. Biotica 7: 8-15
- Shrestha, K, Strobel GA, Shrivastava SP, Gewali MB (2001) Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan Yew of Nepal. Planta Medica 67: 374-376
- Singla, KA, Garg A, Aggarwal D (2002) Paclitaxel and its formulations. International Journal of Pharmaceutics 235: 179-192
- Soliman, SMS, Raizada NM (2013) Interactions between co-habiting fungi elicit synthesis of Taxol from an endophytic fungus in host *Taxus* plants. Frontiers in Microbiology 4: 1-14
- Spencer, CM, Faulds D (1994) Paclitaxel. A review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. Drugs 48: 794-847
- Srekanth, D, Sushim GK, Syed A, Khan BM, Ahmad A (2011) Molecular and morphological characterization of a Taxol-producing endophytic fungus, *Gliocladium* sp., from *Taxus baccata*. Mycobiology 39: 151-157
- Stierle, A., Strobel G, Stierle D (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. Science 260: 214-216
- Stone, JK, Bacon CW, White JF (2000) An overview of endophytic microbes: endophytism defined. Marcel Dekker, Inc. New York 3-29
- Strobel, GA (2003) Endophytes as sources of bioactive products. Microbes and Infection 5: 535-544
- Strobel, GA, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM (1996) Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology 142: 435-440

- Sun, D, Ran X, Wang J (2008) Isolation and identification of a Taxol-producing endophytic fungus from Podocarpus. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 48: 589-595
- Trapp, SC, Croteau RB (2001) Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* 158: 811-832
- Visalakchi, S, Muthumary J (2010) Taxol (anticancer drug) producing endophytic fungi: an overview. *International Journal of Pharma and BioSciences* 1: 1-9
- Walkerm, K, Croteau R (2001) Taxol biosynthetic genes. *Phytochemistry* 58: 1-7
- Walker, K, Schoendorf A, Croteau R (2000) Molecular cloning of a taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 374: 371-380
- Wang, X, Pan L, Mao N, Sun L, Qin X, Yin J (2013) Cell-cycle synchronization reverses Taxol resistance of human ovarian cancer cell lines. *Cancer Cell International* 13: 77-84
- Xiong, ZQ, Yang YY, Zhao N, Wang Y (2013) Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, *Taxus x media*. *Microbiology* 13: 71-80
- Xu, F, Tao WY, Cheng L, Guo LJ (2006) Strain improvement and optimization of the media of Taxol producing fungus *Fusarium mairei*. *Biochemical Engineering Journal* 31: 67-73
- Zhang, JF, Gong S, Guo ZG (2011) Effects of different elicitors on 10-deacetylbaaccatin III-10-O-acetyl transferase activity and cytochrome P450 monooxygenase content in suspension cultures of *Taxus cuspidata* cells. *Cell Biology International Reports* 18: 7-13
- Zhang, J, Zhao J, Zhang W, Liu G, Yin D, Li J, Zhang S, Li H (2012) Establishment of paclitaxel-resistant cell line and the underlying mechanism on drug resistance. *International Journal of Gynecological Cancer* 22: 1450-1456
- Zhang, P, Zhou PP, Jiang C, Yu H, Yu LJ (2008) Screening of Taxol-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus*. *Biotechnology Letters* 30: 2119-2123
- Zhao, K, Ping W, Li Q, Hao S, Zhao L, Gao T, Zhou D (2009) *Aspergillus niger* var. *taxi*, a new species variant of Taxol-producing fungus isolated from *Taxus cuspidata* in China. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1202-1207
- Zhou, X, Zheng W, Zhu H, Tang K (2009) Identification of a Taxol-producing endophytic fungus EFY-36. *African Journal of Biotechnology* 8: 2623-2625

Recibido: 26-12-2013
Aceptado: 11-03-2014