



## TAXOIDES: METABOLITOS SECUNDARIOS DEL ÁRBOL DEL TEJO (*Taxus* spp.)

### TAXOIDS: SECONDARY METABOLITES OF THE YEW TREE (*Taxus* spp.)

Hebert J. Barrales-Cureño<sup>1</sup>; Ramón M. Soto-Hernández.

Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. (<sup>1</sup>Autor para correspondencia) Correo-e: barrales.hebert@colpos.mx

#### RESUMEN

El árbol del tejo (*Taxus* spp.) es una gimnosperma dicotiledónea que pertenece a la familia Taxaceae; se distribuye en América, Europa y Asia. *Taxus* spp. contiene en la corteza y en las hojas, alcaloides diterpénicos conocidos como taxoides. Éstos se caracterizan químicamente por la presencia de un esqueleto de taxano y un anillo de oxetano, tal como el taxol, que es utilizado en el tratamiento del cáncer de ovario, seno, próstata y pulmón; enfermedad que actualmente es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El contenido de taxol es bajo en los árboles, por tanto, es necesario el uso de alternativas biotecnológicas como lo es el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para incrementar la cantidad de taxoides y preservar el recurso natural. En esta revisión científica se reportan las características químicas de los taxoides, el mecanismo de acción biológico y semisíntesis orgánica del taxol, se detalla también la ruta biosintética de los principales taxoides, así como las principales enzimas involucradas para la obtención de éstos a nivel bioquímico y, finalmente, se indica de manera general la producción de taxoides en cultivos *in vitro*.

Recibido: 17 de febrero, 2011  
Aceptado: 2 de mayo, 2012  
doi: 105154/r.rchscfa.2011.02.017  
<http://www.chapingo.mx/revistas>

**PALABRAS CLAVE:** Taxol, biosíntesis, cáncer, cultivo *in vitro*

#### ABSTRACT

The yew tree (*Taxus* spp.) is a dicot gymnosperm belonging to the Taxaceae family and it can be found in America, Europe and Asia. These trees have in their bark and leaves diterpenic alkaloids known as taxoids, which are chemically characterized by the presence of a taxane skeleton and an oxetane ring such as taxol, which is used in the treatment of ovarian, breast, prostate and lung cancer; disease that is currently one of the leading causes of death worldwide. Taxol content is low in trees, so it is necessary to use biotechnology alternatives such as *in vitro* cultivation of plant tissue to increase the amount of taxoids and preserve the natural resource. The chemical characteristics of taxoids, the mechanism of the biological action and the semi-synthetic organic of taxol were reported in this scientific review; as well as, the biosynthetic pathway of major taxoids and the main enzymes involved in obtaining taxoids at biochemical level and, finally the production of taxoids *in vitro* cultures is indicated.

**KEY WORDS:** Taxol, biosynthesis, cancer, *in vitro* culture

#### INTRODUCCIÓN

El tejo (*Taxus* spp.) es una gimnosperma dicotiledónea, perteneciente a la familia Taxaceae. Tiene nueve especies distribuidas alrededor del mundo: *Taxus baccata*, *Taxus canadensis*, *Taxus brevifolia*, *Taxus floridana*, *Taxus mairei*, *Taxus globosa*, *Taxus chinensis*, *Taxus sumatrana* y *Taxus wallichiana*. La especie representativa en México es *T. globosa*; su taxonomía se apoya en la distribución geográfica, de manera discontinua, desde el norte de México (Tamaulipas y Nuevo León) hasta Honduras en Centroamérica; florece de enero a marzo y fructifica de mayo a noviembre; su regeneración natural se basa en las semillas, que no son tóxicas para las aves cuando están cubiertas por un arilo de color rojo (Zavala, Soto, & Rodríguez, 2001).

#### INTRODUCTION

The yew (*Taxus* spp.) is a dicot gymnosperm belonging to the Taxaceae family, with nine species distributed around the world: *Taxus baccata*, *Taxus canadensis*, *Taxus brevifolia*, *Taxus floridana*, *Taxus mairei*, *Taxus globosa*, *Taxus chinensis*, *Taxus sumatrana* and *Taxus wallichiana*. The representative species in Mexico is *T. globosa*; its taxonomy is based on the geographical distribution, discontinuously, from northern Mexico (Tamaulipas and Nuevo León) to Honduras in Central America; it blooms from January to March and fructifies from May to November; its natural regeneration is based on seeds, which are not toxic to birds, when seeds are covered by a red aril (Zavala, Soto, & Rodríguez, 2001).

Los taxoides son metabolitos secundarios que son sintetizados por *Taxus* spp. y se encuentran en el follaje y la corteza de éste. El principal taxoide de interés farmacológico es el taxol; un alcaloide diterpénico polioxygenado aprobado por la Oficina de la Administración de Fármacos y Alimentos (Wickremesinhe & Arteca, 1994). Este taxoide se utiliza en el tratamiento del cáncer de seno, ovario, pulmón y sarcoma de Kaposi relacionado con el VIH (Soto, Sanjujo, González, Cruz, & Giral, 2000). En el año 2002, se estimó que había 10.9 millones de casos nuevos de cáncer, 6.7 millones de muertes y 24.6 millones de personas viviendo con esta enfermedad alrededor del mundo (Parkin, Bray, Ferlay, & Pisani, 2005). Además, el taxol se está probando en el tratamiento de taupatías (afecciones en las proteínas tau), tales como, el Alzheimer's o el Parkinson ligado al cromosoma 17 (Zhang et al., 2005). La cantidad estimada necesaria del fármaco taxol purificado para tratar sólo a 500 pacientes con cáncer es de 1 kg, equivalente al rendimiento de cerca de 10 toneladas de corteza o la tala de 700 árboles. Por consiguiente, el árbol del tejo está expuesto al riesgo de la extinción debido a su tala y uso excesivo (Liao, Chen, Sun, & Tang, 2006).

Los fármacos quimioterapéuticos actúan fundamentalmente inhibiendo el ciclo de la división celular. El taxol, debido a su actividad biológica, se clasifica dentro del grupo de los fármacos antimitóticos. El principal mecanismo de acción de este taxoide consiste en promover la polimerización de microtúbulos, estabilizando los haces con la consiguiente paralización de la mitosis. Así, queda bloqueado el ciclo celular en la transición metafase-anafase induciéndose la apoptosis (Centelles & Imperial, 2010).

Actualmente, algunas alternativas biotecnológicas como la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una fuente promisoría para la inducción de callos y cultivos de células *in vitro* a partir de hojas de la especie mexicana *T. globosa* (Barrales et al., 2011; Barrios, Zhang, Sandoval, & Liao, 2009). En esta revisión se describen la actividad biológica del taxol a nivel celular; las principales características químicas; la semisíntesis orgánica y bioquímica de formación de los taxoides, únicos en la familia Taxaceae; así como las enzimas involucradas en la ruta biosintética, y se presenta de manera general la producción de taxoides en cultivos *in vitro*.

### Aislamiento e identificación del taxol

En 1958, el Instituto Nacional del Cáncer (INC) de Estados Unidos encargó a botánicos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, la recolección de muestras de plantas para comprobar sus propiedades anticancerígenas. Uno de los botánicos, Arthur S. Barclay, recolectó 15 libras de ramas, agujas y corteza de *T. brevifolia* en un bosque cercano al Monte Saint Helens (Baloglu & Kingston, 1999). En 1963, Wall descubrió que las extracciones realizadas a partir de la corteza de esta especie tenían actividad citotóxica contra cánceres humanos (Baloglu & Kingston,

Taxoids are secondary metabolites that are synthesized by *Taxus* spp. and are found in its foliage and bark. The main pharmacological taxoid is the taxol; a polyoxygenated diterpene alkaloid approved by the Food and Drug Administration (Wickremesinhe & Arteca, 1994). This taxoid is used in the treatment of breast, ovarian and lung cancer, and Kaposi's sarcoma associated with HIV (Soto, Sanjujo, González, Cruz, & Giral, 2000). In 2002, it was estimated that there were 10.9 million new cases of cancer, 6.7 million deaths and 24.6 million people living with this disease around the world (Parkin, Bray, Ferlay, & Pisani, 2005). Moreover, taxol is being tested in the treatment of tauopathies (conditions in tau protein) such as, the Alzheimer's or Parkinson's linked to the chromosome 17 (Zhang et al., 2005). The estimated amount of purified taxol required to treat only 500 patients with cancer is 1 kg, equivalent to about 10 tons of bark or felling of 700 trees. Therefore, yew tree is at risk of extinction due to its felling and excessive use (Liao, Chen, Sun, & Tang, 2006).

Chemotherapeutic drugs act primarily inhibiting the cell division cycle. Taxol, due to their biological activity, is classified in the group of antimitotic drugs. The main action mechanism of this taxoid is to promote the microtubule polymerization, stabilizing the beams with the consequent cessation of mitosis. Thus, the cell cycle in metaphase-anaphase transition is blocked, inducing the apoptosis (Centelles & Imperial, 2010).

Today, some biotechnological alternatives such as the *in vitro* culture of plant tissues is a promising source for callus induction and *in vitro* cell culture from leaves of the Mexican species *T. globosa* (Barrales et al., 2011; Barrios, Zhang, Sandoval, & Liao, 2009). In this review we described the biological activity of taxol at cellular level, the main chemical characteristics, the semisynthetic organic and biochemistry formation of taxoids, unique in the Taxaceae family; as well as enzymes involved in the biosynthetic pathway, and we present the production of taxoids in *in vitro* cultures.

### Isolation and identification of taxol

In 1958, the U. S. National Cancer Institute (NCI) requested to botanists of the U.S. Department of Agriculture, the collection of plant samples to test their anticancer properties. One of the botanists, Arthur S. Barclay, collected 15 pounds of branches, needles and bark of *T. brevifolia* in a forest near the Mount Saint Helens (Baloglu & Kingston, 1999). In 1963, Wall observed that the removals made from the bark of this species showed cytotoxic activity against human cancers (Baloglu & Kingston, 1999). In 1968, taxol was discovered and isolated by Wani and Wall at the Research Triangle Institute (RTI) in North Carolina, from the bark of *T. brevifolia* known commonly as Pacific yew. In 1971, Wani and Wall published the results, including the chemical structure (Wani, Taylor, & Wall, 1971). Nowadays,

1999). En 1968, el taxol fue descubierto y aislado por Wani y Wall en el Research Triangle Institute (RTI) en Carolina del Norte, a partir de la corteza de *T. brevifolia* conocido comúnmente como tejo del Pacífico. Wani y Wall publicaron los resultados en 1971, incluyendo la estructura química (Wani, Taylor, & Wall, 1971) et al., 1971). Actualmente, el fármaco se vende con el nombre comercial de Taxol® por Bristol-Myers Squibb, desde 1993. El término paclitaxel se refiere al nombre genérico.

### Características químicas del taxol

La determinación de la estructura química se realizó en 1971 (Jaziri et al., 1996) a partir de los análisis mediante difracción por rayos X. Fue todo un reto para los científicos de la época; así como posteriormente lo fue también, su síntesis total publicada en 1994 (Guo, Kai, Jin, & Tang, 2006). El nombre común para este taxoide ahora es paclitaxel y por lo tanto taxol es una marca registrada. El taxol tiene una estructura química compleja (Figura 1) en la que destaca un esqueleto hidrocarbonado formado por tres ciclos de 6, 8 y 6 carbonos polisustituidos con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas (entre ellas, una de β-fenilisoserina que esterifica la posición C<sub>13</sub>). La molécula posee un total de 11 estereocentros.

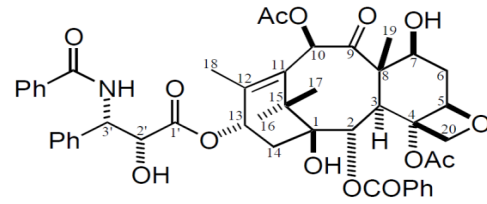
### Semisíntesis

La síntesis química total del taxol no ha tenido éxito y la síntesis parcial requiere a baccatina III como el material de partida, que debe ser extraído del material vegetal; no obstante, se encuentra en niveles bajos en los tejidos vegetales. La síntesis total del paclitaxel fue obtenida, finalmente, por Holton et al. (1994) y por Nicolaou, Yang, y Liu (1994), casi simultáneamente, pero siguiendo secuencias distintas. Sin embargo, este proceso resulta impráctico porque requiere de al menos 28 pasos químicos para la obtención del taxol y el rendimiento es muy bajo. Tanto el taxol como su análogo el docetaxel, se producen semi-sintéticamente a través de la acilación de 10-diacetilbaccatina III aislado de las hojas de diferentes especies de *Taxus*, pero conlleva a contraindicaciones o efectos secundarios no deseados en los pacientes.

### Actividad biológica del taxol

El taxol actúa a nivel del huso mitótico, funcionando como un potente agente quimioterapéutico aprovechado en el tratamiento de una gran variedad de tipos de cáncer: seno, pulmón y ovario, principalmente. Este metabolito vegetal secundario tiene un mecanismo de acción biológico, único y específico, debido a que se encarga del ensamblaje de los microtúbulos e inhibe el proceso del desensamblamiento de la tubulina. El detenimiento del ciclo puede efectuarse en la interfase o en la mitosis (Centelles & Imperial, 2010).

Para entender el efecto del taxol es importante conocer cómo se forma y degrada el huso mitótico, puesto que esta estructura celular es de gran importancia durante la



Paclitaxel (Taxol®) 1.16

FIGURA 1. Estructura química de la molécula de taxol: C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub> P.M.: 853.90 (Tomado de Heinig y Jennewein, 2009)

FIGURE 1. Chemical structure of taxol molecule: C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub> P.M.: 853.90 (Taken from Heinig and Jennewein, 2009)

this drug is sold under the name of Taxol® by Bristo-Myers Squibb, since 1993. The term “paclitaxel” refers to the generic name.

### Chemical properties of taxol

The determination of the chemical structure was performed in 1971 (Jaziri et al., 1996) from analyzes by means of X-ray diffraction, which was a challenge for scientists of that time; and so was the total synthesis published in 1994 (Guo, Kai, Jin, & Tang, 2006). Now, the common name for this taxoid is paclitaxel and therefore taxol is a registered trademark. Taxol has a complex chemical structure (Figure 1) which highlights a hydrocarbon backbone formed by three cycles of 6, 8 and 6 carbons polysubstituted with four methyl's and eight oxygen functions (including one of β-phenylisoserine which esterifies the position C<sub>13</sub>). The molecule has a total of 11 stereocenters.

### Semi-synthesis

The total chemical synthesis of taxol has not been successful and the partial synthesis requires baccatina III as the starting material, which must be extracted from plant material; however, it is found in low levels of plant tissues. The total synthesis of paclitaxel was obtained, finally, by Holton et al. (1994) and Nicolaou, Yang, and Liu (1994), almost simultaneously, but following different consequences. Nonetheless, this process is impractical, because it requires at least 28 chemical steps to obtain taxol and the yield is very low. Both the taxol and its analog docetaxel, are produced semi-synthetically by means of acylation of 10-diacetilbaccatina III isolated from leaves of different species of *Taxus* but it leads to contraindications or undesired side effects in patients.

### Biological activity of taxol

Taxol acts on mitotic spindle, working as a potent chemotherapeutic agent taking advantage in the treatment of a great variety of cancers: breast, lung and ovary, mainly. This secondary plant me-

proliferación celular. Si no es posible formar el huso, las células no podrán duplicarse, evitando así su proliferación. El huso mitótico está formado por microtúbulos, que son tubos formados por la combinación de dos tipos de proteína:  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina. Estas proteínas forman heterodímeros  $\alpha\beta$  capaces de agruparse en polímeros (microtúbulos), en presencia de otras proteínas denominadas proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, microtubule associated protein) de GTP y de  $Mg^{2+}$ . Los microtúbulos son estructuras dinámicas y poseen dos extremos; uno de ellos identificado con un signo matemático (-) donde se inicia la nucleación y el segundo (+) donde el microtúbulo va creciendo. El microtúbulo, cuando inicia su crecimiento, adopta un aspecto cilíndrico de unos 25 nm de diámetro con 13 protofilamentos que forman el círculo (Centelles & Imperial, 2010).

El microtúbulo estabilizado con taxol posee 12 protofilamentos (en lugar de los 13 protofilamentos normales) y un diámetro inferior al normal (22 nm). La estabilización de los microtúbulos provoca la pérdida de función del huso, la consiguiente parada del ciclo celular en la transición metafase-anafase y, finalmente, la muerte celular (Centelles & Imperial, 2010).

### Metabolismo secundario del tejo

En las plantas se sintetiza un gran número de compuestos secundarios que proveen un reservorio para la generación de agentes activos farmacéuticos. Algunas de las funciones ecológicas de los metabolitos secundarios: sirven a las plantas para su adaptación al ambiente y su interrelación con otros organismos; sirven de protección contra la luz UV, el ozono, los herbívoros y contra microorganismos patógenos. Los roles defensivos de los metabolitos secundarios son experimentalmente confirmados por el uso de métodos moleculares modernos (Zulak y Bohlmann, 2010).

Los isoprenoides constituyen una familia compleja de compuestos (más de 35,000 identificados hasta el momento) que presentan una gran variedad de estructuras y funciones. En muchos organismos vegetales existe una dicotomía respecto a la biosíntesis de los precursores de los terpenoides. No obstante, a pesar de su gran diversidad, todos los isoprenoides derivan de dos precursores estructurales comunes de cinco átomos de carbono, el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalildifosfato (DMAPP) (Zulak & Bohlmann, 2010).

El taxol es un compuesto de naturaleza isoprenoide. En el citosol, la ruta clásica del mevalonato produce IPP de acetil coenzima A para la biosíntesis de los sesquiterpenos y triterpenos. Los plastidios son el sitio de la ruta alternativa del no-mevalonato que produce IPP y DMAPP a partir de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato comenzando con los isoprenoides plastídicos: monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (Azcon & Talón, 2008; Cusidó et al., 2007). El esqueleto central de la molécula de taxol es un anillo de

tabolite has a mechanism of biological action, specific and unique, because it takes care of the microtubule assembly and inhibits the process of non-assembly of the tubulin. The interruption of the cycle can be performed in the mitosis or interfase (Centelles & Imperial, 2010).

To understand the effect of taxol is important to know how the mitotic spindle is formed and degraded, because this cell structure is of great importance for cell proliferation. If it is possible to form the spindle, the cell cannot be duplicated, preventing their proliferation. The mitotic spindle consist of microtubules, these tubes are formed by combining two types of protein:  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -tubulin. These proteins form heterodimers  $\alpha\beta$  able to come together in polymers (microtubules), in the presence of other proteins called microtubule-associated proteins (MAPs) of GTP and  $Mg^{2+}$ . Microtubules are dynamic structures and have two ends, one of them is identified with a mathematical sign (-), where the nucleation starts, and the second (+) where the microtubule grows. The microtubule, when it starts to grow, adopts a cylindrical appearance of about 25 nm diameter with 13 protofilaments that form the circle (Centelles & Imperial, 2010).

The taxol-stabilized microtubule has 12 protofilaments (instead of the normal 13 protofilaments) and a smaller diameter than the normal diameter (22 nm). The stabilization of the microtubules causes loss of spindle function, the resulting cell cycle stop in the metaphase-anaphase transition and eventually the death of the cell (Centelles & Imperial, 2010).

### Secondary metabolism of yew

A large amount of secondary compounds are synthesized in plants, providing a reservoir for the generation of pharmaceutical active agents. Some of the ecological functions of secondary metabolites: serve plants to adapt to the environment and its interrelationship with other organisms; provide protection against UV light, ozone, herbivores and against pathogen microorganisms. The defensive roles of secondary metabolites are experimentally confirmed by using modern molecular methods (Zulak and Bohlmann, 2010).

Isoprenoids constitute a complex family of compounds (more than 35,000 identified so far) that exhibit a wide variety of structures and functions. In many plant organisms, there is a dichotomy with respect to the biosynthesis of the precursors of terpenoids. However, despite their wide variety, all isoprenoid derive from two common structural precursors of five carbon atoms, the isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer, dimethylallyl diphosphate (DMAPP) (Zulak & Bohlmann, 2010).

taxano de naturaleza isoprenoide y deriva del geranylgeranyl difosfato (GGPP), el precursor común de los isoprenoides de 20 átomos de carbono llamados diterpenos. Entre éstos se encuentran compuestos, tales como; los carotenoides, la cadena de fitol de las clorofilas o las giberelinas, el ácido abscísico, la cadena isoprenoide de algunas citoquininas que participan en el crecimiento y desarrollo de las plantas, la plastoquinona, la ubiquinona y los fitoesteroles esenciales para la integridad de las biomembranas y los dolicoles (Azcon & Talón, 2008).

**Biosíntesis de los taxoides**

Actualmente, se han realizado muchos avances con respecto a la identificación de los genes responsables de la biosíntesis del taxol o paclitaxel (Cuadro 1). En este proceso se requieren conocer, principalmente, las reacciones enzimáticas que involucran la construcción del esqueleto tetracíclico y la adición de varios oxígenos y grupos funcionales acilo.

Existe una gran variación en el contenido de taxoides, que se debe principalmente a las diferentes especies y variedades. Hasta el momento, se conoce la estructura química de más de 300 taxoides. Éstos se empezaron a clasificar de acuerdo a la oxigenación del C<sub>20</sub> y a la presencia o no de cadenas laterales. Los taxoides más importantes sin la cadena lateral C<sub>13</sub> son baccatina III y sus compuestos derivados; mientras que los principales taxoides con la cadena lateral C<sub>13</sub> son el taxol, cefalomanina y compuestos relacionados (Cusidó et al., 2007).

El taxol es un protoalcaloide (el nitrógeno se encuentra en una cadena alifática y no en un sistema heterocíclico) diterpénico cíclico polioxigenado caracterizado por un sistema de anillo de taxano; es portador de una cadena lateral derivada de la fenilalanina, la N-benzoil-(2R-3S)-3-fenilisoserina. La síntesis del taxol implica una descarboxilación del aminoácido precursor que da lugar a las respectivas aminas simples, de las que, mediante modificaciones estructurales, se origina el protoalcaloide

Taxol is a compound of the isoprenoid nature. In the cytosol, the classical pathway of mevalonate produces IPP of acetyl coenzyme A for the biosynthesis of sesquiterpenes and triterpenes. The plastids are the site of the alternative route of non-mevalonate, which produce IPP and DMAPP from pyruvate and glyceraldehyde-3-phosphate starting with plastid isoprenoids: monoterpenes, diterpenes and tetraterpenes (Azcon & Talón, 2008; Cusidó et al., 2007). The central skeleton of the taxol molecule is a taxane ring of isoprenoid nature and derived from the geranylgeranyl diphosphate (GGPP), the common precursor of isoprenoids of 20 carbon atoms called diterpenes. Among these we found compounds such as: carotenoids, phytol chain of chlorophylls or gibberellins, abscisic acid, isoprenoid chain of some cytokinins, which are involved in the growth and development of plants, plastoquinone, ubiquinone and phytosterols essential for the integrity of biomembranes and dolichols (Azcon & Talón, 2008).

**Biosynthesis of taxoids**

Today, many advances with respect to the identification of genes responsible of biosynthesis of taxol and paclitaxel have been conducted (Table 1). In this process it is necessary to know, primarily, the enzymatic reactions of the tetracyclic skeleton construction and the addition of various oxygens and acyl functional groups.

There are several variations in the content of taxoids, mainly, due to the different species and varieties. So far, the chemical structure of over 300 taxoids is known. These taxoids were first classified according to the oxygenation of C<sub>20</sub> and the presence or no presence of side chains. The most important taxoids without side chain C<sub>13</sub> are baccatin III and its derivative compounds, while the main taxoids with side chain C<sub>13</sub> are taxol, cephalomannine and related compounds (Cusidó et al., 2007).

Taxol is a polyoxygenated cyclic diterpene protoalcaloide (nitrogen is found in an aliphatic chain and not in a

**CUADRO 1. Genes clonados involucrados en la ruta de biosíntesis del taxol a partir del cDNA correspondiente a la enzima (Modificado de Walker y Croteau, 2001).**

Enzima	Pares de bases	Peso (kDa)
Taxadieno sintasa	2,586	98.3
Geranyl geranyl difosfato sintasa	1,182	42.6
Taxano 10-β hidroxilasa	1,494	56.7
Taxano 13-α hidroxilasa	1,458	54.7
Taxano 2-α hidroxilasa	1,488	55.0
Taxano 7-β hidroxilasa	1,503	56.3
Taxano 5-α hidroxilasa	1,509	56.8
Fenilalanina aminomutasa	2,094	76.5

**TABLE 1. Cloned genes involved in the biosynthetic pathway of taxol from the cDNA corresponding to the enzyme (Modified from Walker and Croteau, 2001).**

Enzyme	Base pairs	Weight (kDa)
Taxadien synthase	2,586	98.3
geranylgeranyl diphosphate synthase	1,182	42.6
Taxane 10-β hydroxylase	1,494	56.7
Taxane 13-α hydroxylase	1,458	54.7
Taxane 2-α hydroxylase	1,488	55.0
Taxane 7-β hydroxylase	1,503	56.3
Taxane 5-α hydroxylase	1,509	56.8
Phenylalanine aminomutase	2,094	76.5

(Azcón & Talón, 2008); su biosíntesis en las plantas de *Taxus* spp. no se conoce completamente. El anillo de oxetano es principalmente encontrado en las especies de *Taxus* spp. La formación de este anillo en la biosíntesis del taxol (Figura 2) involucra dos enzimas: 1) CitP450 C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> epoxidasa y 2) isomerasa (oxomutasa) (Frense, 2007). Los estudios sobre la biosíntesis de taxol muestran que el sistema de anillo de los taxoides no se sintetiza vía mevalonato, sino por la ruta plástica del no-mevalonato o ruta del metil-4-eritritol-fosfato (MEP), lo cual es coherente con su naturaleza de diterpenos (Eisenreich, Mewnhard, Hylands, Zenk, & Bacher, 1996).

El primer paso en la biosíntesis de taxol (Figura 3) 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 que presenta el esqueleto de taxoide. Esta reacción es catalizada por la enzima taxadieno sintasa (TS), una enzima formada por una proteína monomérica de 79 kDa con propiedades similares a otras ciclasas de terpenoides. La enzima fue purificada y caracterizada por Hezari, Lewis, Croteau (1995) y los genes que codifican para la TS fueron identificados y clonados por Wildung y Croteau (1996). El producto de la reacción es la hidroxilación de la posición del C<sub>5</sub> por la enzima Cit P450 taxadieno-5 $\alpha$ -hidroxilasa (T5 $\alpha$ H) para formar taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol. Esta enzima, aparte de su actividad hidroxilativa, tiene condiciones de migración del doble enlace de 4(5) a 4(20). Estos dos pasos metabólicos, ciclización e hidroxilación, son bajos y no se observan por ser limitantes en la velocidad de la biosíntesis del taxol (Hefner et al., 1996). El próximo paso en la ruta de biosíntesis que comienza a formar el taxol es catalizado por una enzima específica: taxadieno-5 $\alpha$ -ol-O-acetil transferasa (TDAT) que acila taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol a la posición del C<sub>5</sub> para formar taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -yl-acetato. Este taxoide se hidroxila por una P450-dependiente monooxigenasa, encontrada en *T. cuspidata* (tejo japonés), la cual cataliza la hidroxilación a la posición C<sub>10</sub> para producir taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ ,10 $\beta$ -diol 5-acetato. La enzima que controla este paso, la taxoide 10 $\beta$ -hidroxilasa (T10 $\beta$ H), fue clonada y caracterizada funcionalmente en levaduras (Schoendorf, Rithner, Williams, & Croteau, 2000).

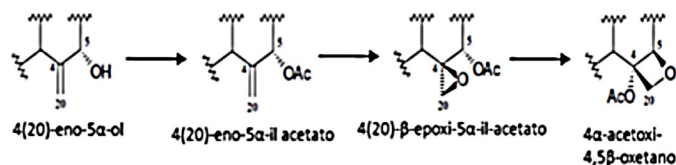


FIGURA 2. Esquema de biosíntesis para la formación del anillo de oxetano en taxoides. (Modificado de Heinig y Jennewein, 2009).

FIGURE. Biosynthetic scheme for the formation of the oxetane ring in taxoids. (Modified from Heinig and Jennewein, 2009).

heterocyclic system) characterized by a taxane ring system; it is carrier of side chain derived from phenylalanine, N-benzoyl-(2R, 3S)-3-phenylisoserine. The synthesis of taxol involves a decarboxylation of the amino acid, which leads to the respective simple amines, of which, by structural changes originates protoalcaloide (Azcón & Talón, 2008); its biosynthesis in *Taxus* spp. plant is not fully understood. The oxetane ring is mainly found in *Taxus* spp. species. The formation of this ring in the biosynthesis of taxol (Figure 2) involves two enzymes: 1) CitP<sub>450</sub> C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> epoxidase and 2) isomerase (oxomutasa) (Frense, 2007). Studies on taxol biosynthesis show that the ring system is not synthesized by the mevalonate pathway, but by the non-mevalonate pathway or methyl-4-erythritol phosphate pathway (MEP), which is consistent with the nature of diterpenes (Eisenreich, Mewnhard, Hylands, Zenk, & Bacher, 1996).

The first step in taxol biosynthesis (Figure 3) is the cyclization of geranylgeranyl diphosphate (GGPP), which begins with the formation of taxa-(4,5), (11,12)-diene, which is the first compound in the biosynthetic pathway of taxol that shows the taxoid skeleton. This reaction is catalyzed by the enzyme taxadiene synthase (TS), an enzyme formed by a 79 kDa monomeric protein with properties similar to other terpenoid cyclases. The enzyme was purified and characterized by Hezari, Lewis, Croteau (1995) and genes coding for the TS were identified and cloned by Wildung and Croteau (1996). The reaction product is the hydroxylation of the position of C<sub>5</sub> by the enzyme Cyt P450 taxadiene-5 $\alpha$ -hydroxylase (T5 $\alpha$ H) to form taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol. This enzyme, apart from its hydroxylation activity, it has migration conditions of the double bond of 4(5) to 4(20).

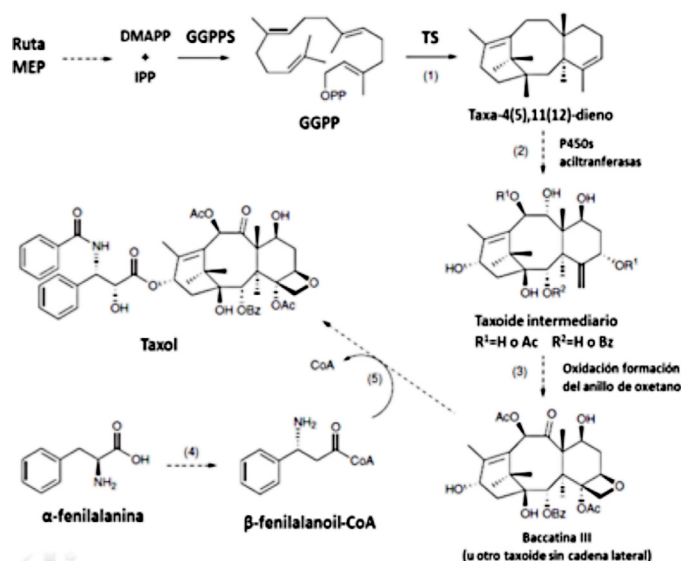


FIGURA 3. Esquema de la ruta de biosíntesis de los taxoides en *Taxus* spp. (Modificado de Guo et al., 2006)

FIGURE 3. Scheme of the biosynthetic pathway of taxoids in *Taxus* spp. (Modified from Guo et al., 2006)

Jennewein, Rithner, Williams, y Croteau (2001) encontraron una Cit P450-dependiente hidroxilasa usando taxa-4(20),11(29)-dien-5 $\alpha$ -ol como sustrato, comenzando con ello la formación de taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -13 $\alpha$ -diol. La enzima taxol 13 $\alpha$ -hidroxilasa (T13 $\alpha$ H) presenta 63 % de identidad y 67 % similitud con la hidroxilasa responsable para la hidroxilación en la posición C<sub>10</sub>. Al mismo tiempo, el hecho de que esta enzima use el mismo sustrato, como taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol (TDAD), sugiere que la biosíntesis del taxol no es una ruta lineal y que algunas ramas de la ruta pueden dar comienzo a otros taxoides relacionados. Se ha observado que este paso alternativo fue especialmente frecuente en cultivos de células elicidadas con metil jasmonato (Wheeler et al., 2001). Posteriormente, se encontró otra Cit P450-dependiente de hidroxilasa (taxoide 14 $\beta$ -hidroxilasa; T14 $\beta$ H) responsable para la producción de taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ -acetoxi-10 $\beta$ -14 $\beta$ -diol (Jennewein, Rithner, Williams, & Croteau, 2003). Esta enzima utiliza sustratos hidroxilando a la posición del C<sub>10</sub>, pero no los hidroxila a la posición C<sub>13</sub>, sugiriendo que podría estar involucrada en la producción del taxol desde este compuesto sin presentar alguna hidroxilación a la posición C<sub>14</sub>. Después de la formación de taxa-4(20),11(12)-dien-5 $\alpha$ ,10 $\beta$ -diol 5-acetato se originan hidroxilaciones en las posiciones de C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>7</sub>, oxidación de C<sub>9</sub> y epoxidación en el doble enlace C<sub>4</sub>C<sub>5</sub> en la ruta biosintética del taxol. El orden de las hidroxilaciones mediadas por enzimas Citocromo P450 no es completamente conocido; pero sobre la base de la frecuencia de la oxidación de los taxoides se ha encontrado en cultivo de células, una secuencia probable que podría ser: C<sub>5</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>13</sub> y finalmente C<sub>1</sub>. Se debe tomar en cuenta que algunos de los taxoides considerados podrían no participar en la formación del taxol o podrían ser artefactos de los cultivos *in vitro*. Esta secuencia de oxidación se ha validado por análisis filogenéticos de enzimas taxoide oxigenasas P450 clonadas previamente (Vongpaseuth & Roberts, 2007).

Sin embargo, la formación del anillo de oxetano es también muy importante, ya que es esencial para la actividad anti-cáncer de la molécula del taxol. Se han propuesto diferentes mecanismos para su formación. En la actualidad se acepta que tal proceso involucra la epoxidación del puente doble 4(20) seguido por una migración del grupo  $\alpha$ -acetoxi del C<sub>5</sub> a la posición C<sub>4</sub>, junto con la expansión del oxirano al grupo oxetano. Es posible que la formación de oxirano-oxetano preceda a la hidroxilación del C<sub>1</sub> en la biosíntesis del taxol, y en este caso el intermediario polihidroxilado hipotético podría ser más bien un taxadien-hexaol que un heptaol hidroxilado a C<sub>1</sub> (Croteau, Ketchum, Long, Kospera, & Wildung, 2006). La enzima que epoxida el doble enlace C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> aún no se ha caracterizado funcionalmente y la expansión del anillo de oxirano-oxetano es también un paso incompletamente conocido.

Después de la formación del precursor polihidroxilado hipotético por la actividad de la enzima 2 $\alpha$ -O-benzoyl

These two metabolic steps, cyclization and hydroxylation, are low and not shown because they are constraints in the speed of taxol biosynthesis (Hefner et al., 1996). The next step in the biosynthetic pathway that begins to form taxol is catalyzed by a specific enzyme: taxadiene-5 $\alpha$ -ol-O-acetyl transferase (TDAT) that acylates taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol at the C<sub>5</sub> position to form taxa-4 (20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -yl-acetate. This taxoid is hydroxylated by P<sub>450</sub>-dependent monooxygenase, found in *T. cuspidata* (Japanese yew), which catalyzes the hydroxylation at the C<sub>10</sub> position to produce taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ , 10 $\beta$ -diol 5-acetate. The enzyme that controls this step, the taxoid 10 $\beta$ -hydroxylase (T10 $\beta$ H) was cloned and characterized functionally in yeast (Schoendorf, Rithner, Williams, & Croteau, 2000).

Jennewein, Rithner, Williams, and Croteau (2001) found a Cyt P450-dependent hydroxylase using taxa-4(20), 11(29)-dien-5 $\alpha$ -ol as substrate, starting thereby the formation of taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -13 $\alpha$ -diol. The taxol enzyme 13 $\alpha$ -hydroxylase (T13 $\alpha$ H) shows 63% identity and 67% similarity to the hydroxylase responsible for hydroxylation at the C<sub>10</sub> position. While the fact that this enzyme uses the same substrate, as taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -ol (TDAD) suggests that the biosynthesis of taxol is not a linear path and that some branches of the path may initiate other related taxoids. It has been observed that this alternative step was particularly frequently in cultured cells elicited with methyl jasmonate (Wheeler et al., 2001). Subsequently, another Cyt P450-dependent hydroxylase (taxoid 14 $\beta$ -hydroxylase; T14 $\beta$ H) was found, which is responsible for the production of taxa-4(20), 11(12)-dien-5 $\alpha$ -10 $\beta$ -acetoxi-14 $\beta$ -diol (Jennewein, Rithner, Williams, & Croteau, 2003). This enzyme uses substrates hydroxylated at the C<sub>10</sub> position, but not at the C<sub>13</sub> position, suggesting it could be involved in the production of taxol from this compound without specific hydroxylation at the C<sub>14</sub> position. After the formation of taxa-4 (20), 11 (12)-dien-5 $\alpha$ , 10 $\beta$ -diol 5-acetate, hydroxylations are originated in positions C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub> and C<sub>7</sub>, oxidation of C<sub>9</sub> and epoxidation of the double bond C<sub>4</sub> C<sub>5</sub> in the biosynthetic pathway of taxol. The order of the hydroxylations mediated by cytochrome P<sub>450</sub> enzymes is not completely known, but based on the frequency of the oxidation of taxoids, a likely sequence that could be: C<sub>5</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>9</sub>, C<sub>13</sub> and finally C<sub>1</sub> has been found in cell cultures. It should be taken into account that some taxoids considered could not participate in the formation of taxol or may be artifacts of *in vitro* cultures. This sequence of oxidation has been validated by phylogenetic analyzes of previously cloned P<sub>450</sub> oxygenase taxoid enzymes (Vongpaseuth & Roberts, 2007).

However, the formation of the oxetane ring is also very important, since it is essential for anti-cancer activity of taxol molecule. Different mechanisms have been proposed for their formation. Nowadays, it is accepted that this process involves the epoxidation of double bond 4(20) followed by

transferasa (DBT), el próximo compuesto obtenido es 10-diacetil baccatina III. La enzima 10-deacetil-baccatinIII-10-O-acetyl transferasa (DBAT) acila el grupo hidroxilo a la posición del C<sub>10</sub> para formar baccatina III. Un paso esencial en la biosíntesis del taxol es la esterificación del C<sub>13</sub> del grupo hidroxilo de la baccatina III con la cadena lateral β-fenilalanoil-CoA. La cadena lateral es obtenida del aminoácido α-fenilalanina por la acción de la fenilalanina aminomutasa (PAM) (Walker, Klettke, Akiyama, & Croteau, 2004). La enzima C<sub>13</sub>-fenilpropanoil-CoA transferasa (BAPT) cataliza la conjugación de la cadena lateral de la β-fenilalanoil-CoA a baccatina III, mejorando o produciendo el compuesto 3'-N-debenzoil-2'-deoxitaxol (Figura 4). Este compuesto hidroxila la posición C<sub>2</sub> por la acción de una enzima desconocida Cit P450-dependiente hidroxilasa, y la enzima 3'-N-debenzoil-2'-deoxitaxol N-benzoil transferasa (DBTNBT) conjuga a benzoil-CoA a 3'-N-debenzoil-2'-deoxitaxol produciendo taxol como un compuesto final (Walker, Long, & Croteau, 2002).

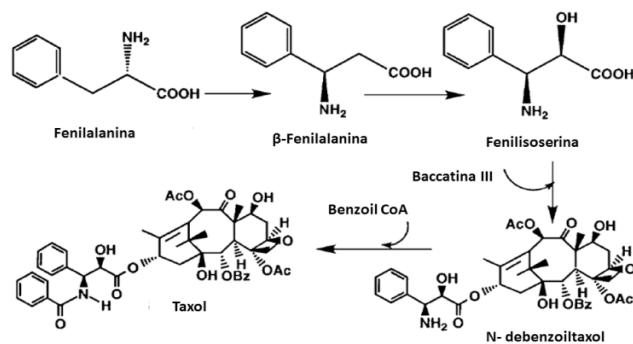


FIGURA 4. Biosíntesis de la cadena lateral de C-13 del diterpeno taxol (Modificado de Guo et al., 2006).

FIGURE 4. Biosynthesis of the side chain of C-13 of diterpene taxol (Modified from Guo et al., 2006).

### Producción de taxoides en cultivos *in vitro*

Christen, Biand, y Gibson (1989) reportaron por primera vez la producción de taxol usando cultivos celulares de *Taxus*. Después, muchos científicos empezaron a optimizar las condiciones para el crecimiento prolífico de las células e incrementar la producción de taxoides en varios sistemas de cultivo *in vitro*, tales como, células, raíces, tallos y cultivos embriogénicos de diferentes especies de *Taxus* (Mirjalili & Linden, 1996). El cultivo de células de *Taxus* en suspensión a partir de callos *in vitro* es considerada una herramienta promisoriosa para producir taxol y taxoides relacionados. Por tal motivo, se ha investigado extensamente el contenido de taxol en diferentes cultivos de *Taxus* spp., tanto para optimizar la tasa de producción como para incrementarlo (Barrales et al., 2009, 2011; Khosroushahi et al., 2006; Nguyen, Eshraghi, Gonyea, Ream, & Smith, 2001; Tabata, 2006;

a migration of the α-acetoxy group from the C<sub>5</sub> position to C<sub>4</sub>, along with the expansion of the oxirane to the oxetane group. It is possible that the formation of oxirane-oxetane precedes hydroxylation of C<sub>1</sub> in taxol biosynthesis, and in this case the intermediary polyhydroxylated scenario could be more of a taxadien-hexaol than a hydroxylated heptaol at C<sub>1</sub> (Croteau, Ketchum, Long, Kospera, & Wildung, 2006). The enzyme that epoxidizes the double bond C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> has not yet been functionally characterized and the expansion of the oxirane-oxetane ring is also a incompletely known step.

After the formation of the precursor polyhydroxylated by the activity of the enzyme 2α-O-benzoyl transferase (DBT), the next compound obtained is Baccatin III 10-diacetyl. The enzyme 10-deacetyl-baccatinIII-10-O-acetyl transferase (DBAT) acylates the hydroxyl group at the position of C<sub>10</sub> to form baccatin III. An essential step in the biosynthesis of taxol is the esterification of C<sub>13</sub> from the hydroxyl group of baccatin III with the side chain β-fenilalanoil-CoA. The side chain is obtained from the amino acid α-phenylalanine by means of the action of phenylalanine aminomutase (PAM) (Walker, Klettke, Akiyama, & Croteau, 2004). The enzyme C<sub>13</sub>-phenylpropanoyl-CoA transferase (BAPT) catalyzes the combination of the side chain of the β-phenylalanoil-CoA with baccatine III, improving or producing the compound 3'-N-debenzoyl-2'-deoxitaxol (Figure 4). This compound hydroxylates the C<sub>2</sub> position by means of an action of unknown enzyme Cyt P450-dependent hydroxylase and the 3'-N-debenzoyl-2'-deoxitaxol Nbenzoil transferase (DBTNBT) combines benzoil-CoA with 3'-N-debenzoyl-2'-deoxitaxol producing taxol as a final compound (Walker, Long, & Croteau, 2002).

### Taxoids production in *in vitro* cultures

Christen, Biand, and Gibson (1989) reported for the first time, the production of taxol using cell cultures of *Taxus*. Later, many scientists began to optimize the conditions for prolific growth of cells and increase the production of taxoids in several *in vitro* systems, such as cells, roots, stems and embryogenic cultures of different *Taxus* species (Mirjalili & Linden, 1996). The cultivation of *Taxus* cells in suspension from callus *in vitro* is considered a promising tool to produce taxol and related taxoids. For this reason, the content of taxol in different cultures of *Taxus* spp. has been extensively investigated, both to optimize the production rate and to increase it (Barrales et al., 2009, 2011; Khosroushahi et al., 2006; Nguyen, Eshraghi, Gonyea, Ream, & Smith, 2001; Tabata, 2006; Zhong, 2002). The *in vitro* culture media used for initiation, proliferation and maintenance of callus and cell cultures in suspension of *Taxus* spp., are the Gamborg's basal medium (B5), MS Murashige & Skoog, 1962) and Woody Plant Medium (WPM) (Frense, 2007). In few species of *Taxus*, other taxoids have been observed such as baccatin III (Agrawal et al., 2000), epitaxol and



Zhong, 2002). Los medios de cultivo utilizados *in vitro* para la iniciación, proliferación y mantenimiento de los callos y cultivos de células en suspensión de *Taxus* spp., son el medio basal Gamborg's (B5), MS (Murashige & Skoog, 1962) y Medio vegetal Woody (WPM) (Frense, 2007). En pocas especies de *Taxus* se han detectado otros taxoides tales como: baccatina III (Agrawal et al., 2000), epitaxol y 7-epi-10-diacetil taxol (KetchumTandon, Gibson, Begley, & Shuler, 1999), y 10-diacetil taxol en *T. baccata* (Vander et al., 1994), entre otros. En el Cuadro 2 se presenta la tasa de producción de taxol en cultivos *in vitro* de células de *Taxus* spp. en sistemas de matraces y biorreactores. El tamaño de inóculo, periodo de subcultivo, intensidad de luz y fotoperiodo, son factores decisivos para la multiplicación, apariencia fenotípica, producción de taxol y proliferación de células de *Taxus* spp. (Hirasuna, Pestchanker, Srinivasan, & Shuler, 1996; Navia-Osorio et al., 2002). Además, la suplementación de sustancias orgánicas tales como: caseína hidrolizada, polivinil pirrolidona (PVP), ácido ascórbico y aminoácidos esenciales como glutamina, ácido aspártico, prolina, fenilalanina y vitaminas en el medio, puede incrementar el crecimiento celular de los callos y células de *Taxus* spp. (Navia-Osorio et al., 2002).

**CUADRO 2. Tasa de producción de taxol extracelular en cultivos celulares de *Taxus* spp. (Modificado de Frense, 2007).**

Línea celular	Tasa de producción (mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Referencia
<b>En matraces</b>		
<i>T. baccata</i>	1.02	Khosroushahi et al. (2006)
<i>T. canadensis</i>	1.68	Kim et al. (2006)
<i>T. chinensis</i>	2.24	Kim et al. (2001)
<i>T. mairei</i>	4.76	Mulabagal y Tsay (2004)
<i>T. cuspidata</i>	5.32	Nguyen et al. (2001)
<b>En biorreactores</b>		
<i>T. cuspidata</i>	0.11	Son et al. (2000)
<i>T. media</i>	0.53	Cusidó et al. (2002)
<i>T. wallichiana</i>	0.75	Navia-Osorio et al. (2002)
<i>T. chinensis</i>	1.50	Wang et al. (2001)
<i>T. yunnanensis</i>	1.90	Zhang et al. (2002)
<i>T. baccata</i>	2.71	Bentebibel et al. (2005)

### CONCLUSIONES

Los taxoides son de gran importancia comercial debido a la actividad anti-cáncer que presentan. Estos taxoides se aíslan a partir de la corteza y follaje de árboles de *Taxus*. Las técnicas de cultivo *in vitro* de callos y células vegetales se explotan para el aislamiento de líneas celulares productoras de taxol. El cultivo *in vitro* de *Taxus*

7-epi-10-diacetyl taxol (KetchumTandon, Gibson, Begley, & Shuler, 1999), and 10-diacetyl taxol in *T. baccata* (Vander et al., 1994), among others. Table 2 shows the production rate of taxol in *in vitro* cultures of *Taxus* spp. Cells in flasks and bioreactors systems. The size of inoculum, time of subculturing, light intensity and photoperiod, are decisive factors for multiplication, phenotypic appearance, taxol production and proliferation of *Taxus* spp. cells (Hirasuna, Pestchanker, Srinivasan, & Shuler, 1996; Navia-Osorio et al., 2002). Furthermore, the supplementation of organic substances such as: casein hydrolyzate, polyvinyl pyrrolidone (PVP), ascorbic acid and essential amino acids such as glutamine acid, aspartic acid, proline, phenylalanine and vitamins in the medium, can increase cell growth of callus and *Taxus* spp cells. (Navia-Osorio et al., 2002).

**TABLE 2. Production rate of extracellular taxol in cell cultures of *Taxus* spp. (Modified from Frense, 2007).**

Cell line	Production Rate (mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Reference
<b>Flask system</b>		
<i>T. baccata</i>	1.02	Khosroushahi et al. (2006)
<i>T. canadensis</i>	1.68	Kim et al. (2006)
<i>T. chinensis</i>	2.24	Kim et al. (2001)
<i>T. mairei</i>	4.76	Mulabagal y Tsay (2004)
<i>T. cuspidata</i>	5.32	Nguyen et al. (2001)
<b>Bioreactor system</b>		
<i>T. cuspidata</i>	0.11	Son et al. (2000)
<i>T. media</i>	0.53	Cusidó et al. (2002)
<i>T. wallichiana</i>	0.75	Navia-Osorio et al. (2002)
<i>T. chinensis</i>	1.50	Wang et al. (2001)
<i>T. yunnanensis</i>	1.90	Zhang et al. (2002)
<i>T. baccata</i>	2.71	Bentebibel et al. (2005)

### CONCLUSIONS

Taxoids are of great commercial importance due to the anti-cancer activity they exhibit. These taxoids are isolated from the bark and foliage of *Taxus* trees. The techniques of *in vitro* cultures of callus and plant cells are exploited for the isolation of cell lines producing taxol. The *in vitro* culture of *Taxus* not only helps to conserve this valuable natural resource, but it is considered a feasible biotechnological alternative; moreover, it has a wide sustainable use in the production of taxol drug and related taxoids. Although the biosynthetic pathways is not completely understood; the knowledge of the key enzymes in the biosynthesis of taxol is important to perform molecular biology experiments and identify the genes that generate a greater production of it

no sólo ayuda a la conservación de este valioso recurso natural, sino que se considera una alternativa biotecnológica viable; además tiene un amplio uso sustentable en la producción del fármaco taxol y taxoides relacionados. Aunque la ruta biosintética no se conoce completamente; el conocimiento de las enzimas clave en la biosíntesis del taxol es importante para hacer experimentos de biología molecular e identificar los genes que expresen una producción mayor de éste y otros taxoides relacionados con las especies de *Taxus*, mediante estrategias de elicitación de tipo biótico o abiótico.

### AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a la M.C. Petra Andrade-Hoyos por sus valiosas sugerencias al presente artículo y al Colegio de Postgraduados por el Fideicomiso Institucional Núm. 167304 otorgado para el desarrollo del proyecto de investigación.

### REFERENCIAS

- Agrawal, S., Banerjee, S., Chattopadhyay, S. K., Kulshreshtha, M., Musudanan, K. P., Mehta, V. K., & Kumar, S. (2000). Isolation of taxoids from cell suspension cultures of *Taxus wallichiana*. *Plant Medica*, 66, 1–3. doi: 10.1055/s-2000-9782.
- Azcón, B. J., & Talón, M. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. España: McGraw-Hill.
- Baloglu, E., & Kingston, D. G. I. (1999). The taxane diterpenoids. *Journal of Natural Products*, 62, 1448–1472. doi: 10.1021/np990176i
- Barrales, C. H. J., Soto, H. M., Ramos, V. A. C., Luna, P. R. G., Trejo, T. L. I., Martínez, V. M., & Ramírez, G. M. E. (2009). Inducción de callos *in vitro* de *Taxus globosa* a partir de acículas. *Revista Latinoamericana de Química*, Suplemento especial ISSN 0370-5943. pp. 89.
- Barrales, C. H. J., Soto, H. R. M., Ramos, V. A. C., Trejo, T. L. I., Martínez, V. M., Ramírez, G. M. E., López, U. J. (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.
- Barrios, H., Zhang, Y., Sandoval, C., & Xiao, Z. (2009). Increase of taxol production in *Taxus globosa* Shoot callus by Chlorocholine Chloride. *Open Natural Products Journal*, 2, 33–37. doi:10.2174/1874848100902010033
- Bentebibel, S., Moyano, E., Palazón, J., Cusidó, R. M., Bonfill, M., Eibl, R., & Piñol, M. T. (2005). Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 647–655. doi: 10.1002/bit.20321
- Centelles, J., & Imperial, S. (2010). Paclitaxel, descubrimiento, propiedades y uso clínico. *Fitoterapia*, 29, 69–75.
- Christen, A. A., Bland, J., & Gibson, D. M. (1989). Cell cultures as a means to produce taxol. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 30, 566.
- and other taxoids related with the *Taxus* species, by means of biotic or abiotic elicitation strategies.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The author thank to M.C. Petra Andrade-Hoyos for her suggestions to this article, and to the Colegio de Postgraduados for the institutional trust fund No. 167304 granted for the development of the present research.

End of English Version

Croteau, R. B., Ketchum, R. E. B., Long, R. M., Kaspera, R., & Wildung, M. R. (2006). Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews*, 5, 75–97. doi:10.1007/s11101-005-3748-2

Cusidó, R. M., Palazón, J., Bonfill, M., Expositó, O., Moyano, E., & Piñol M. T. (2007). Source of isopentenyl diphosphate for taxol and baccatin III biosynthesis in cell cultures of *Taxus baccata*. *Biochemical Engineering Journal*, 33, 159–167. doi:10.1016/j.bej.2006.10.016

Cusidó, R. M., Palazón, J., Bonfill, M., Navia, O. A., Morales, C., & Piñol, M. T. (2002). Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. *Biotechnology Progress*, 18, 418–423. doi: 10.1021/bp0101583

Eisenreich, W., Mewnhard, B., Hylands, P. J., Zenk, M. H., & Bacher, A. (1996). Studies on the biosynthesis of taxol: The taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 6431–6436.

Frense, D. (2007). Taxanes: Perspectives for biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1233–1240. doi: 10.1007/s00253-006-0711-0

Guo, B. H., Kai, G. Y., Jin, H. B., & Tang, K. X. (2006). Taxol synthesis. *African Journal of Biotechnology*, 5(1), 15–20.

Hefner, J., Rubenstein, S. M., Ketchum, R. E. B., Gibson, D. M., Williams, R. M., & Croteau, R. (1996). Cytochrome p450-catalyzed hydroxylation of taxa-4(5), 11(12)-dien to taxa-4(20),11(12)-dien-alpha-ol. The first oxygenation step in taxol biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 3, 479. doi:10.1016/S1074-5521(96)90096-4

Heinig, U., & Jennewein S. (2009). Taxol: A complex diterpenoid natural product with an evolutionarily obscure origin. *African Journal of Biotechnology*, 8(8), 1370–1385.

Hezari, M., Lewis, N. G., & Croteau, R. (1995). Purification and characterization of taxa-4(5), 11(12)-diene synthase from pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322, 437

Hirasuna, T. J., Pestchanker, L. J., Srinivasan, V., & Shuler M. L. (1996). Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44, 95–102. doi: 10.1007/BF00048185

- Holton, R. A., Somoza, C., Kim, H. B., Liang, F., Biediger, R. J., & Boatman, P. D. (1994). First total synthesis of taxol 1. Functionalization of the B ring. *Journal of American Chemical Society*, *116*, 1599–1600. doi: 10.1021/ja00083a066
- Jaziri, M., Zhiri, A., Guo, Y., Dupont, J., Shimomura, K., Hamada, H., ... Homes, J. (1996). *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: A literatura survey. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *46*, 59–75. doi: 10.1007/BF00039697
- Jennewein, S., Rithner, C. H. D., Williams, R. M., & Croteau, R. (2003). Taxol metabolism: Taxoid 14 $\beta$ -hydroxylase is a Cytochrome p450-dependent monooxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *413*, 262–270. doi: 10.1016/S0003-9861(03)00090-0
- Jennewein, S., Rithner, CH. D., Williams, R. M., & Croteau, R. B. (2001) Taxol biosynthesis: Taxane 13 $\alpha$ -hidroxilase is a Cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*, 13595–13600. doi:10.1073/pnas.251539398
- Ketchum, R. E. B., Tandon, M., Gibson, D. M., Begley, T., & Shuler, M. L. (1999). Isolation of labeled 9-Dihydrobaccatin III and related taxoids from cell cultures of *Taxus canadensis* elicited with methyl jasmonate. *Journal of Natural Products*, *62*, 1395–1398. doi: 10.1021/np990201k
- Khosroushahi, A. Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Kim, B. J., Gibson, D. M., & Shuler, M. L. (2006). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*, *30*, 262–269. doi:10.1016/j.cellbi.2005.11.004
- Kim, B. J., Gibson, D. M., & Shuler, M. L. (2006). Effect of the plant peptide regulator, phytosulfokine- $\alpha$ , on the growth and taxol production from *Taxus* sp. suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, *95*, 8–14. doi: 10.1002/bit.20934
- Kim, S. I., Choi, H. K., Kim, J. H., Lee, H. S., & Hong, S. S. (2001). Effect of osmotic pressure on paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus chinensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, *28*, 202–209. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00292-1
- Liao, Z., Chen, M., Sun, X., & Tang, K. (2006). Micropropagation of endangered plant species. *Methods Molecular Biology*, *318*, 179–185. doi: 10.1385/1-59259-959-1:179
- Mirjalili, N., & Linden, J. C. (1996). Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: Ethylene interaction and induction models. *Biotechnology Progress*, *12*, 110–118. doi: 10.1021/bp9500831
- Mulabagal, V., & Tsay, H. S. (2004). Plant Cell Cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, *2*, 29–48.
- Murashige, T., & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Navia-Osorio, A., Garden, H., Cusido, R. M., Palazon, J., Alfermann, A. W., & Piñol, M. T. (2002). Taxol and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor. *Journal of Plant Physiology*, *159*, 97–102. doi: 10.1078/0176-1617-00576
- Nguyen, T., Eshraghi, J., Gonyea, G., Ream, R., & Smith, R. (2001). Studies on factors influencing stability and recovery of paclitaxel from suspension media and cultures of *Taxus uspidate* cv *Densiformis* by High-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *911*, 55–61. doi: 10.1016/S0021-9673(00)01272-3
- Nicolaou, K. C., Yang, Z., & Liu, J. J. (1994). Total synthesis of taxol. *Nature*, *367*, 630–634. doi:10.1038/367630a0
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *55*, 74–108.
- Schoendorf, A., Rithner, C. H. D., Williams, R., & Croteau, R. B. (2000). Molecular cloning of a Cytochrome p450 taxane 10 $\beta$ -hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *98*, 1501–1506. doi:10.1073/pnas.98.4.1501
- Son, S. H., Choi, S. M., Lee, Y. H., Choi, K. B., Yun, S. R., Kim, J. K., ... Park, Y. G. (2000). Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidate* (Japanese yew) using a novel bioreactor. *Plant Cell Reports*, *19*, 628–633. doi: 10.1007/s002990050784
- Soto, M., Sanjurjo, M., González, M., Cruz, D., & Giral, F. (2000). El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. *Ciencia Ergo Sum*, *7*, 277–279.
- Tabata, H. (2006). Production of paclitaxel and the related Taxanes by cell suspension cultures of *Taxus* species. *Current Drug Targets*, *7*, 453–461. doi: 10.2174/138945006776359368
- Vander, V. D. G., George, G. I., Gollapudi, S. R., Jampani, H. B., Liang, X. Z., Mitscher, L. A., & Ye, Q. M. (1994). Wallichiol, a taxol congener with a novel carbon skeleton, from Himalayan *Taxus wallichiana*. *Journal of Natural Products*, *57*(6), 862–867. doi: 10.1021/np50108a032
- Vongpaseuth, K., & Roberts, S. C. (2007). Advancements in the understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *8*, 219–236. doi: 10.2174/138920107781387393
- Walker, K., & Croteau R. (2001). Taxol biosynthetic genes. *Phytochemistry*, *58*, 1–7. doi: 10.1016/S0031-9422(01)00160-1
- Walker, K., Long, R., & Croteau, R. (2002). The final acylation step in taxol biosynthesis: Cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*, 9166–9171. doi: 10.1073/pnas.082115799
- Walker, K., Klettke, K., Akiyama, T., & Croteau, R. B. (2004). Cloning, heterologous expression, and characterization

- of a phenylalanine aminomutase involved in taxol biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 53947–53954. doi: 10.1074/jbc.M411215200
- Wang, C., Wu, J., & Mei, X. (2001). Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 404–410. doi: 10.1007/s002530000567
- Wani, M. C., Taylor, H. L., & Wall, M. E. (1971). Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93, 2325–2327. doi:10.1021/ja00738a045
- Wheeler, A. L., Long, R. M., Ketchum, R. E., Rithner, C. D., Williams, R. M., & Croteau, R. (2001). Taxol biosynthesis: Differential transformations of taxadien-5 $\alpha$ -ol and its acetate ester by Cytochrome p450 hydroxylases from *Taxus* suspension cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 390, 265–278. doi: 10.1006/abbi.2001.2377
- Wickremesinhe, E. R. M., & Arteca, R. N. (1994). *Taxus* cell suspension cultures: Optimizing growth and taxol production. *Journal of Plant Physiology*, 144, 183–188. doi: 10.1016/S0176-1617(11)80541-9
- Wildung, M. R., & Croteau, R. (1996). A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 9201–9204. doi: 10.1074/jbc.271.16.9201
- Zavala, C. F., Soto, H. M., & Rodríguez, M. T. (2001). El romerillo (*Taxus globosa* Schlecht.): Biología, dificultades y perspectivas de uso. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 7(1), 77–94.
- Zhang, B., Maiti, A., Shively, S., Lakhani, F., McDonald, J. G., & Bruce, J. (2005). Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(1), 227–231. doi:10.1073/pnas.0406361102
- Zhang, C. H., Wu, J. Y., & He, G. Y. (2002). Effects of inoculum size and age on biomass growth and paclitaxel production of elicitor-treated *Taxus yunnanensis* cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 396–402. doi:10.1007/s00253-002-1130-5
- Zhong, J. J. (2002). Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 591–599. doi: 10.1016/S1389-1723(02)80200-6
- Zulak, K. G., & Bohlmann, J. (2010). Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 86–97. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00910.x