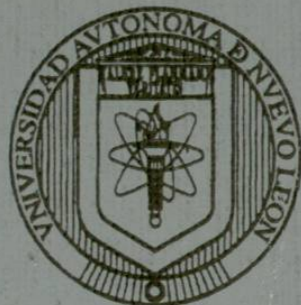


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO



**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
ESTABILIZADORA DE MICROTUBULOS DE
FRACCIONES RICAS EN DITERPENOIDES OBTENIDAS
MEDIANTE HPLC DE EXTRACTOS DE HOJAS,
TALLOS Y CORTEZA DE *Taxus globosa*.**

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA
DE PRODUCTOS NATURALES
POR**

Q.F.I. DELIA ELVA CRUZ VEGA

Monterrey, N.L. México

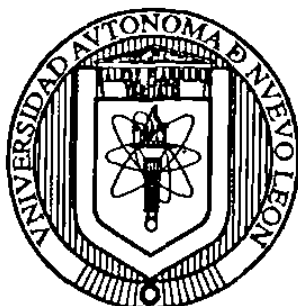
Enero de 1996.





1080073264

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO



**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
ESTABILIZADORA DE MICROTUBULOS DE
FRACCIONES RICAS EN DITERPENOIDES OBTENIDAS
MEDIANTE HPLC DE EXTRACTOS DE HOJAS, TALLOS
Y CORTEZA DE *Taxus globosa*.**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA DE
PRODUCTOS NATURALES.

POR

Q.F.I. DELIA ELVA CRUZ VEGA

DIRECTOR DE TESIS:

Dra.Ma.Teresa González Garza y Barrón

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO

**“DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
ESTABILIZADORA DE MICROTUBULOS DE
FRACCIONES RICAS EN DITERPENOIDES OBTENIDAS
MEDIANTE HPLC DE EXTRACTOS DE HOJAS, TALLOS
Y CORTEZA DE *Taxus globosa*”.**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA DE
PRODUCTOS NATURALES.

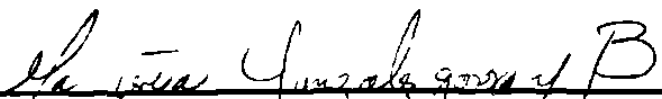
POR

Q.F.I. DELIA ELVA CRUZ VEGA



Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón
Director de Tesis

APROBACION DE COMISION DE TESIS:



Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón
PRESIDENTE



M.C. Enrique Ramírez Bon
SECRETARIO



Dra. Ma. Julia Verde Star
VOCAL

TM
RC271
.T38
C7

Biblioteca Central
UANL
FONDO
TESIS
(73264)

BURRO RONDOL FILOS
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

INDICE

	PAGINA
INDICE	I
DEDICATORIAS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VI
I. RESUMEN	I
II. INTRODUCCION	
1. Antecedentes científicos	3
2. Planteamiento del problema	11
3. Hipótesis	11
4. Objetivos	12
III. MATERIALES	
1. Equipo	13
2. Reactivos	14
3. Material Biológico	15
IV. METODOS	
1. Tratamiento de las fracciones diterpénicas de hojas, tallos verdes y corteza de <i>Taxus globosa</i>	17
2. Composición y preparación de las soluciones	17
3. Preparación del medio de cultivo McCoy.	23
4. Obtención de tubulina a partir de cerebro.	24
5. Determinación de proteínas totales por el método de Hartree	26

6. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS	28
7. Determinación de la actividad estabilizadora de microtúbulos de las fracciones diterpénicas por espectrofotometría	30
8. Microscopía electrónica	31
9. Cultivo de células de la línea CHO.....	32
10. Inmunofluorescencia	33

V. RESULTADOS

1. Obtención de fracciones ricas en diterpenoides	35
2. Rendimiento de tubulina purificada	35
3. Determinación de la actividad estabilizadora de microtúbulos por el método espectrofotométrico.....	37
4. Microfotografías.	41
5. Actividad polimerizadora de microtúbulos por el método de inmunofluorescencia en cultivos de células de ovario de hámster chino.....	45

VI. DISCUSION	47
---------------------	----

VII. CONCLUSIONES	53
-------------------------	----

VIII. PERSPECTIVAS	54
--------------------------	----

IX. BIBLIOGRAFIA	55
------------------------	----

DEDICATORIAS:

A mis hijos David y Aida con todo mi amor.

A mis padres por su confianza, apoyo, cariño y ese gran deseo de superación que siempre me inculcaron.

A mis hermanos por su cariño y apoyo en todo momento.

A todos mis amigos que siempre estuvieron presentes.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a la Dra. Ma. Teresa González Garza por haber aceptado ser la asesora de ésta tesis, por su apoyo, sus consejos y su gran dirección para poder concluir ésta meta tan importante para mi.

Al Dr. Marcos Soto Hernández por su colaboración, en la obtención de las muestras de *Taxus globosa*.

Al Dr. Francisco Giral Hernández por su valiosa aportación e interés mostrado durante todo el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Salvador Said Fernández, Director del CIBIN y al Dr. Diego González Ramírez, Jefe de la División de Farmacología del CIBIN, por el apoyo y la confianza que tuvieron para que realizara mi maestría.

A los integrantes de mi comisión de tesis Dra. María Julia Verde Star y M.C. Enrique Ramírez Bon por sus sugerencias y acertada revisión.

A la Dra. Gloria Benítez King y Biol. Lourdes Huerto Delgadillo del Instituto Nacional de Neurología, por su asesoría en el método de extracción de tubulina.

Al Ing. Esequiel Solís de la Facultad de Agronomía, Ing. Eduardo Dávila del Centro de Salud Animal, Unión Ganadera Regional N.L., por su intervención en la obtención de los cerebros de cabrito.

Al Dr. Juan Antonio Luna de la Rosa por el apoyo con el trabajo fotográfico que se utilizó en el presente trabajo.

A mis compañeros y amigos del CIBIN que me brindaron siempre su apoyo y amistad en todo momento y que compartieron conmigo circunstancias importantes de mi vida.

LISTA DE FIGURAS, GRAFICAS Y TABLAS.

FIGURAS	PAGINA
1.- Fórmula estructural del taxol.	5
2.- Esquema de la composición de un microtúbulo.....	6
3.- Diagrama de flujo de la obtención de tubulina a partir de cerebro.....	25
4.- Procedimiento para utilizar el equipo de electroforesis.....	29
5.- Patrón electroforético de diferentes etapas del proceso de extracción de tubulina.....	38
6.- Electroforesis de la tubulina purificada.....	39
7.- Microfotografías de tubulina en presencia de las muestras de <i>Taxus globosa</i>	44
8.- Microfotografías de células de la línea CHO en presencia de taxol	46
9.- Microfotografías de células de la línea CHO con DMSO.....	46
10.- Microfotografías de células de la línea CHO con las fracciones de <i>T. globosa</i>	46
11.- Estructuras de taxanas aisladas de especies de <i>Taxus</i>	51
GRAFICAS	
1.- Curva de polimerización de (a) GTP, (b) taxol, y (c) fracción de corteza de <i>T. globosa</i>	40
2.- Curva de polimerización de las fracciones de hojas, tallos y corteza de <i>T. globosa</i>	42
TABLAS	
1.- Esquema de la determinación de proteínas por el método de Hartree modificado para el uso de microplacas (micrométodo).	27
2.- Porcentaje de taxol determinado por cromatografía en capa delgada de las fracciones obtenidas a partir de extractos de hojas, tallos y corteza de la especie mexicana <i>T. globosa</i>	36
3.- Porcentaje de actividad de taxol de las fracciones obtenidas a partir de extractos de hojas, tallos y corteza de la especie mexicana <i>T. globosa</i> . determinado por la actividad de polimerización de tubulina.....	43
4.- Cronología del taxol desde su identificación hasta su aplicación clínica.....	48
5.- Actividad citotóxica del taxol y sus análogos sobre líneas celulares tumorales en cultivo.....	52

ABREVIATURAS

BT	Amortiguador isotónico de Tris
cbp	Cuanto baste para
°C	Grados centígrados
cm	Centímetro
d	Días
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGTA	Ac. Etilen glicol-bis(β-aminoetileter)N,N,N',N'-Tetracético
Fig.	Figura
g	Gramos
GTP	Guanosin 5'- trifosfato
h	Horas
Kg	Kilogramos
MES	Ac. 2-(N-Morfolin) etanosulfónico
M	Concentración molar
mM	Milimolar
mg	Miligramos
ml	Militros
mm	Milímetros
min	Minutos
N	Concentración normal
nm	Nanómetros
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PM	Peso molecular
pH	Potencial de Hidrógeno
%	Por ciento
rpm	Revoluciones por minuto
SAB	Seroalbúmina bovina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
T.A.	Temperatura ambiente
TEMED	N-N-N'-tetrametil etilen diamina
Tris	Tris-hidroximetil-amino metano
µg	Microgramo
µM	Micromolar
µl	Microlitros
V	Voltios

I. RESUMEN

La constante búsqueda de compuestos anticancerosos más potentes y efectivos incluye la investigación en productos de origen vegetal. El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, realizó una búsqueda que incluyó 6,000 especies vegetales, resultando el descubrimiento del taxol; este compuesto es un diterpenoide, altamente acilado con una compleja cadena lateral adicional esterificada; derivado biogénicamente del pirofosfato de geranylgeraniol. Se obtuvo inicialmente de la corteza del tejo americano *Taxus brevifolia* con un rendimiento de 0.01-0.03%, limitando extremadamente su disponibilidad. El taxol ha sido descrito como la droga más importante descrita en la última década por su enorme potencial que ofrece sobre varios tumores altamente malignos como melanoma, cáncer renal, de mama, epitelial de ovario, de pulmón y leucemia refractarias; cuyo mecanismo de acción es el de estabilizar los microtúbulos. El taxol se ha obtenido de otras especies del género *Taxus* como: el tejo inglés *T. baccata*, canadiense *T. canadensis*, japonés *T. cuspidata*, chino *T. chinensis*, *T. wallichiana*, *T. yunnanensis*; y más recientemente de un hongo del floema del tronco de *T. brevifolia* clasificado como *Taxomyces andreanae*. El objetivo de este trabajo, fue analizar extractos de la especie mexicana *Taxus globosa*, con el fin de determinar la presencia de taxol y/o moléculas estructuralmente relacionadas con la actividad estabilizadora de microtúbulos. Las muestras de corteza, hoja y tallo de *Taxus globosa* fueron colectados durante el mes de agosto en el Parque Nacional "El Chico" en el estado de Hidalgo. Los extractos metanólicos obtenidos de tallo, hojas y corteza fueron fraccionados por HPLC; a la fracción que presentó el mismo tiempo de retención que el estándar de taxol, se le determinó la actividad estabilizadora de microtúbulos.

por el método turbidimétrico, confirmándose la formación de microtúbulos y por técnicas de inmunofluorescencia, su actividad polimerizadora de microtúbulos sobre cultivos de células de ovario de Hámster Chino (CHO).

Los resultados en cuanto al porcentaje de taxol fueron en hojas 0.013%, corteza 0.008% y tallos 0.004%. Resulta importante resaltar que es mayor el rendimiento en hojas y no en corteza como sucede en el *Taxus brevifolia*.

Los resultados demostraron la presencia de compuestos diterpénicos con actividad estabilizadora de microtúbulos en fracciones obtenidas de corteza, hoja y tallo. Sin embargo, las pruebas turbidimétricas muestran que la fracción de corteza es 1.85 veces más potente que la fracción de hoja y 2.94 veces más potente que el tallo. Lo que puede deberse a la presencia de enantiómeros o tratarse de moléculas estructuralmente cercanas al taxol. Las micrografías electrónicas comprobaron la polimerización de la tubulina por las tres fracciones, comprobándose por inmunofluorescencia en los cultivos celulares. Por lo que puede concluirse que los compuestos diterpenoides obtenidos de corteza, tallos y hojas de *Taxus globosa* tienen actividad estabilizadora de microtúbulos. El hecho de que en las fracciones de hojas se observe actividad y el rendimiento sea mayor que en corteza, permite sugerir la utilización de ésta fuente o la búsqueda de cultivos vegetales como una alternativa para obtener taxol o derivados.

II. INTRODUCCION

1. Antecedentes Científicos.

La importancia de los productos naturales en medicina, se basa no solamente en sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos sino en la posibilidad que ofrecen para poder desarrollar a partir de sus estructuras nuevas drogas (Phillipson. 1994). En la quimioterapia del cáncer, ha sido muy importante la aportación de compuestos desarrollados a partir de productos naturales, como ejemplo podemos citar a los alcaloides de la vinca (*Catharantus roseus*) vincristina y vinblastina; maytansina obtenida a partir de *Maytemus ovatus* y el más recientemente descubierto, del tejo americano o *Taxus brevifolia*: el taxol. Dentro de estas drogas antitumorales que actualmente se usan en la práctica médica la vinblastina y la vincristina (Black et al. 1990), éstas inhiben la formación del huso mitótico durante la división celular, interfiriendo con el sistema tubulina- microtúbulos de ahí su citotoxicidad contra la célula tumoral al detener el ciclo celular durante la mitosis, ya que impide que se forme el huso acromático durante la metafase, quedando los cromosomas a la deriva sin poder migrar a los polos para dar lugar a dos nuevos núcleos y consecuentemente a las células hijas.

Descubrimiento.

En los últimos años ha tomado especial importancia un compuesto diterpenoide denominado Taxol, el cual fue descubierto en la década de los sesenta como resultado de investigaciones por parte del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos Americanos (NCI, USA) por medio de bioensayos dirigidos en fracciones del extracto obtenido a partir de la corteza de una conífera, el tejo del pacífico o tejo americano (*T. brevifolia*), utilizando líneas tumorales y sistemas de leucemia murina; posteriormente, el taxol fue identificado como la

forma activa (Wani et al. 1971). Su nombre deriva de la especie de la cual se extrajo inicialmente, *Taxus brevifolia*.

Composición química.

El taxol es un compuesto diterpenoide que posee un esqueleto de 20 carbonos tipo taxana denominado baccatin III, con una compleja cadena lateral adicional (N-benzoil-β-feniloserina éster) la cual se encuentra adicionada en el carbono trece (Kingston. 1991) Es derivado biogénicamente del pirofosfato de geranilgeraniol, la fórmula molecular del taxol es: C₄₇ H₅₁ NO₁₄, y su fórmula estructural se observa en la fig. 1. Recientemente fue publicada la síntesis total del taxol (Nicolau et al. 1994), pero debido a que es una molécula altamente compleja ya que cuenta con once centros asimétricos y 2048 isómeros estéricos potenciales (Heiinstein et al. 1994); esto hace que su síntesis resulte extremadamente difícil y por el momento no viable comercialmente.

Mecanismo de acción.

Los microtúbulos son proteínas globulares, los cuales dentro de sus funciones están ser los elementos primarios básicos del huso mitótico. Los microtúbulos están en un equilibrio dinámico con sus subunidades proteicas básicas las cuales son dímeros de tubulina (Fig. 2). La tubulina es una proteína heterodimérica, esta constituida por dos unidades: la tubulina Alfa y Beta; la tubulina tiene un peso molecular de 110 Kd por lo que cada unidad tiene un peso aproximado de 55 Kd (Kirchner. 1978), siendo ligeramente más pesada la tubulina alfa. La dirección de este equilibrio hacia el ensamble o desensamble parece ser determinado por

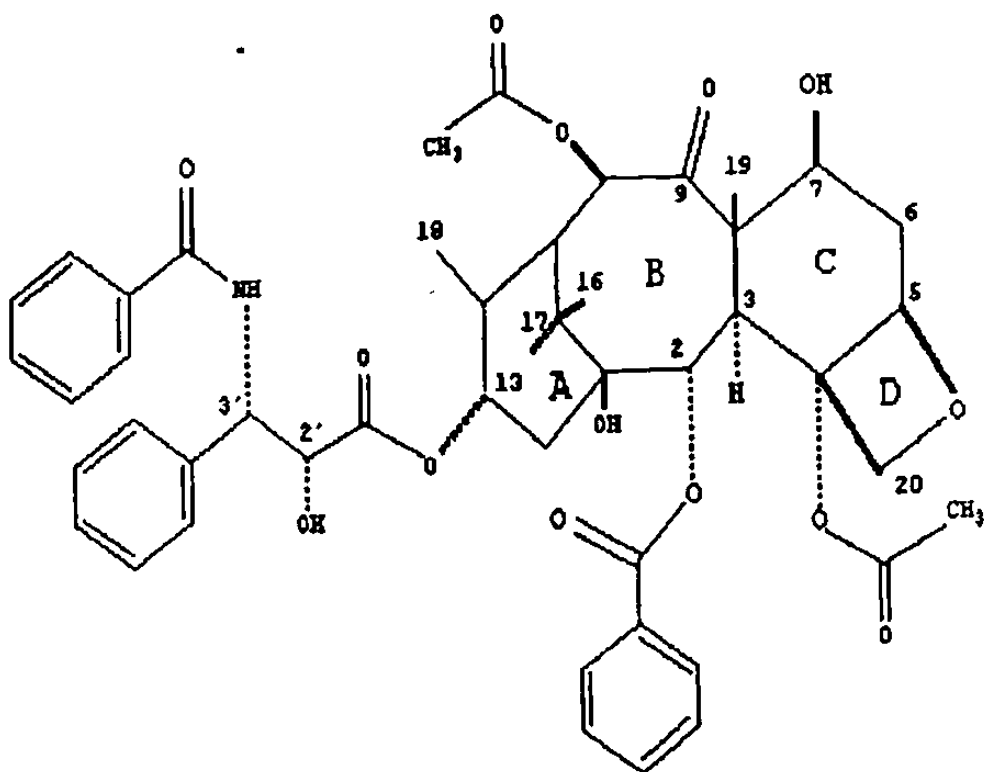


Figura No. 1.- Fórmula estructural del taxol. (β -benzoilamino)- α -hidroxi-6,12b-bis(acetiloxi)-12-12-(benzoiloxi)2a,3,4,4a,5,6,9,10,11,12,12a,12b-dodecahidro-4,11-dihidroxi-4 α ,8,13,13-tetrametil-5-oxo7,11-metano-1H-ciclodeca[3.4]benzo[1,2-b]oxetil-9ester,2aR-[2a α ,4 β ,4a β ,6 β ,9 α (α R*, β S*),1 α ,12 α ,12a α ,12b α].

MICROTUBULO



α β
**Heterodímero
 de
 tubulina**

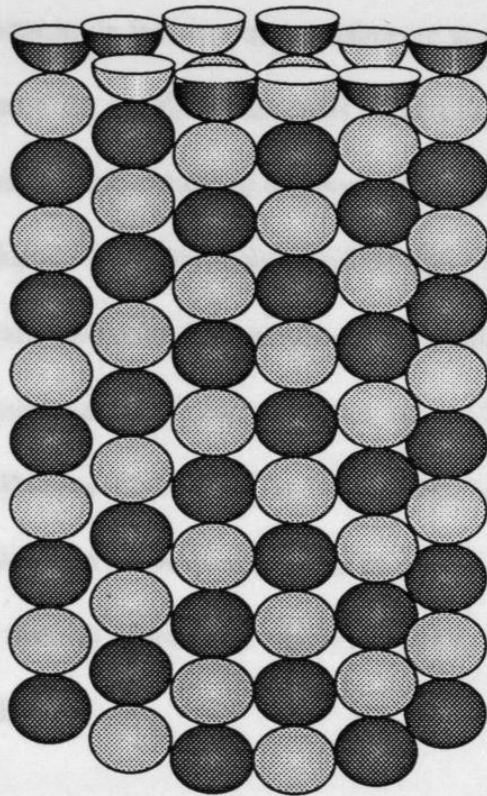


Figura No. 2.- Esquema de la composición de un microtúbulo.

señales generadas durante fases específicas del ciclo celular por reguladores como guanosin trifosfato (GTP) y calcio (Manfredi et al 1984). El primero induce el ensamble, mientras que el segundo es el que induce el desensamble.

El taxol disminuye la concentración crítica de tubulina requerida para el ensamble de microtúbulos, produciéndose ésta aun en ausencia de factores que usualmente son esenciales para la polimerización, como el GTP exógeno o las proteínas asociadas a microtúbulos (Shiff et al. 1981; Hamel et al. 1981). Interfiere con el ciclo celular al promover el ensamble de los microtúbulos, e inhibir su desensamble cambiando la dinámica de equilibrio entre los dímeros de tubulina hacia la polimerización, resultando microtúbulos excesivamente estables aun en presencia de iones Ca^{++} (Guéritte-Voegelein et al. 1991; Shiff et al. 1979) Como consecuencia, se detiene la división celular (Parness et al. 1983), lo que provoca la muerte de las células, siendo más sensibles las de división rápida. (De Brabander et al. 1981). El sitio de unión del taxol sobre los microtúbulos es distinto al sitio de unión del GTP, colchicina, podofilotoxina y vinblastina (Shiff et al. 1981).

Estudios Preclínicos.

Los estudios en sistemas experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, confirmaron su potencial como agente anticancerígeno con una impresionante destrucción de células tumorales así como también de tumores sólidos (Manfredi et al. 1984; Donehower. 1987, Fan et al. 1987) Demostró ser tóxico a un gran número de tumores humanos implantados en ratones, incluyendo cáncer de ovario (Riondel et al. 1986 y 1988). La evaluación preclínica del taxol mostró ser tóxico al tracto gastrointestinal, medula ósea y linfocitos (Rowinsky et al. 1990).

Estos resultados no fueron sorprendentes, ya que los tejidos afectados están compuestos de células de división rápida, las cuales son más susceptibles a las drogas antineoplásicas comúnmente usadas. Como la droga es poco soluble en agua, fue necesario formularla en aceite de castor polioxetilado “cromofor” (Lassus et al. 1985), al cual se asocian las reacciones severas de hipersensibilidad.

Estudios Clínicos.

La actividad antineoplásica observada en fase I, fue en varios tipos de tumores incluyendo melanoma, adenocarcinoma, carcinoma refractario de ovario, carcinoma de pulmón, gástrico, colon, cabeza y cuello (Rowinsky et al. 1989). Además, en la fase I y II se observaron arritmias, lo que se agregó a la necesidad de tener al paciente monitoreado durante las administraciones. La forma de administración y la premedicación hicieron al taxol inicialmente inaceptable para pacientes no hospitalizados. En estudios de fase I posteriores, se logró administrar el taxol por 6 horas en pacientes externos sin monitoreo cardíaco y premedicación en donde solo 1 de 30 pacientes experimentaron reacciones de hipersensibilidad y no hubo episodios de cardiotoxicidad (Sarosy et al. 1992; McGuire. 1992). La más importante actividad antineoplásica que se ha observado con el taxol, es en cáncer epitelial de ovario. Un estudio en 40 pacientes en estado avanzado tuvieron una respuesta alta, los resultados fueron particularmente importantes por las siguientes razones: a) se incluían los pacientes pretratados con radiación y quimioterapia, b) se obtuvo respuesta significativa en 6 de 25 (24%) en pacientes refractarios a Cisplatino (crecimiento del tumor

mientras recibían Cisplatino, o recurrencia del tumor en 6 meses después de cesar la administración) y 6 de 15 (40%) que no mostraron una clara refracción al mismo

Estudios en fase II, han reportado una actividad significativa en carcinomas de ovario refractarios avanzados, con una respuesta en el 37% de los pacientes que habían sido previamente tratados con Cisplatino no más de una vez. Hubo respuesta en 7 de 14 pacientes que no eran claramente refractarios al Cisplatino y en 8 de 24 claramente resistentes. La dosis se redujo a $175\text{mg}/\text{m}^2$ (Lipton et al. 1988).

Actualmente se encuentran en proceso otros estudios de fase II con otro tipo de tumores altamente malignos como el melanoma, el cáncer renal, de mama, de pulmón y leucemia refractarias (Rowinski et al. 1989; Markman et al. 1992; Legha et al. 1990)

Debido a los resultados obtenidos en fase I y II, el taxol ha sido descrito como la droga más importante descubierta en la última década por su enorme potencial ya que a pesar de su alta toxicidad, ofrece una poderosa alternativa para pacientes con cáncer de ovario refractario a la quimioterapia con Cisplatino (Beijnen. 1992). A finales de 1992 una presentación comercial de taxol fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en los Estados Unidos Americanos para el tratamiento de cáncer de ovario avanzado con el nombre de paclitaxel (Iwao et al. 1994).

Abastecimiento.

Se obtiene de la corteza del tejo americano en cantidades de 50 a 150 mg de taxol/kg de corteza, requiriéndose aproximadamente procesar la corteza de tres árboles para el tratamiento de un paciente de cáncer. Tomando en cuenta que es un recurso no renovable, y

que el árbol requiere de más de 100 años para alcanzar la madurez y que el rendimiento de taxol es muy pobre, ha significado un gran problema en su investigación. Dada la importancia que ha tomado el taxol en la quimioterapia del cáncer, la búsqueda de nuevas fuentes de taxol se ha intensificado; informándose que también puede ser obtenido del tejo inglés *Taxus baccata* que es cultivado para fines ornamentales (Senelh et al. 1984), del tejo japonés *Taxus cuspidata* (Fett et al. 1992), del tejo chino *T. chinensis* (Xu et al. 1989), de *T. wallichiana* (Miller et al. 1981), *T. yunnanensis* (Chen et al. 1991) y de *T. canadensis* (Zamir et al. 1992). Además se han realizado investigaciones en algunos de los otros compuestos encontrados en el extracto diterpénico junto con el taxol, más de 100 derivados tipo taxana se han aislado a partir de varias especies de tejos (Barboni et al. 1994). Por medio de técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución, se han logrado separar los seis compuestos diterpénicos que se encuentran en mayor cantidad en los extractos: taxol, cefalomanine, bacatin III y sus derivados deacetilados en el carbón 10 (Witherup et al 1989). A éstos compuestos se les ha comprobado actividad anticancerígena, por lo que se encuentran en estudio; también se ha encontrado que un hongo del floema del tronco de *T. brevifolia* clasificado como *Taxomyces andreanae* produce taxol en pequeñas cantidades (Stierele et al. 1993).

Origen taxonómico.

Es una gimnosperma, del orden de los *Taxales*, Familia *Taxaceae*; las especies de este género se distribuyen en las regiones templadas de Asia, Europa, Africa del Norte y América del Norte. En la República Mexicana se distribuye una sola especie: *Taxus globosa* Schectendal, la cual se

distribuye desde el noreste del país (Nuevo León y Tamaulipas), pasando por la cuenca del Golfo y el eje neovolcánico transversal hasta Honduras en Centro América.

2. Planteamiento del Problema.

El cáncer es una enfermedad que puede desarrollarse en el hombre sin importar edad, nivel socioeconómico o características étnicas. Su índice de morbilidad y mortalidad sigue siendo muy alto, a pesar de que los métodos de diagnóstico y tratamiento oportuno se han mejorado mucho, y de que se han ampliado considerablemente los lapsos de supervivencia (Boletín de Morbilidad y Mortalidad 1994). Sin embargo aún no se cuenta con el fármaco ideal para los casos en los que las enfermedades neoplásicas se han establecido o cuando la enfermedad se detecta con un gran estado de avance (Black. 1990) y que resultan refractarios a los fármacos con los que actualmente se cuenta. Es por ello que está ampliamente justificada la búsqueda constante de drogas más efectivas para el tratamiento de los muy variados tipos de cáncer. El taxol ha tomado especial importancia por los prometedores resultados en los estudios de fase I y II. Actualmente la FDA (Food and Drug Administration) aprobó un medicamento a base de taxol que se obtiene de la corteza de *Taxus brevifolia* paclitaxel, el cual es un recurso no renovable. Por lo cual es importante la búsqueda de otras fuentes de taxol. En éste estudio se pretende determinar la presencia de taxol o moléculas relacionadas, con actividad estabilizadora de microtúbulos en un representante del género *Taxus*.

3. Hipótesis

Se ha demostrado que varias especies del género *Taxus* de origen europeo, asiático y norteamericano sintetizan un compuesto diterpenoide llamado taxol con actividad

estabilizadora de microtúbulos, por lo que es de esperarse que especies mexicanas del género *Taxus* también sintetizen dicho compuesto y/o compuestos relacionados.

4. Objetivos.

General:

Determinar la presencia de actividad estabilizadora de microtúbulos en extractos diterpénicos de tallos verdes, hojas y corteza de *Taxus globosa*, fraccionados por cromatografía en columna y por HPLC.

Específicos:

- Determinación de la actividad estabilizadora de microtúbulos en las fracciones diterpénicas obtenidas, mediante polimerización de tubulina pura por técnicas espectrofotométricas.
- Confirmar la formación de microtúbulos en las muestras preparadas para el análisis espectrofotométrico, por microscopía electrónica.
- Determinar la actividad polimerizadora de microtúbulos de las muestras obtenidas sobre células de ovario de hámster chino (CHO) en cultivo.

III. MATERIALES

1. Equipo.

- Equipo de disección
- Balanza analítica (Sartorius.)
- Potenciómetro (Beckman Century SS-1.)
- Homogeinizador mecánico tipo Elvehjem-Potter.
- Centrífuga (Damon/IEC, USA) B-20 A (refrigerada), rotor 11/79, y 289.
- Ultracentrífuga (IEC, USA) B-60, rotor 10/79.
- Agitador mecánico con temperatura controlada (New Brunswick Scientific, USA)
- Refrigerador (congelador) Revco a -70°C
- Termo-Baño (*Felisa*)
- Vortex (Thermolyne, USA) T-37600
- Lector de microplacas EIA multi-well reader (SIGMA, USA)
- Microplacas de poliestireno de fondo plano con 96 pozos (SIGMA, USA) .
- Equipo de electroforesis (Bio-Rad, USA)
- Fuente de poder (CAMAG)
- Placa de calentamiento (CORNING, USA) PC-320.
- Espectrofotómetro (Carl Zeiss, ALEMANIA) Mod. PM Q III.
- Celdas de cuarzo de 1 ml.
- Tubos Leighton con tapón de rosca.
- Laminillas de 25 X 5 mm.

- Botellas de cultivo de 25 cm² de superficie con tapón de rosca (Falcon, CA, USA)
- Incubadora de CO₂ (National, USA).
- Hematimetro (American Optical Scientific Instruments Div., USA)
- Microscopio invertido Modelo "D" (Carl Zeiss).
- Microscopio compuesto (Carl Zeiss.)
- Microscopio de epifluorescencia con filtros para DAPI, FITC/rojo Texas, Mod. "Standard 25 II Z" (Carl Zeiss.)
- Centrífuga refrigerada (SORVALL, USA).
- Rejillas de cobre de 400 mallas cubiertas con formvar y carbón para microscopía electrónica.
- Microscopio electrónico marca (Zeiss) EM-109.

2. Reactivos.

- Glicina, EDTA, cloruro de manganeso, GTP, EGTA, taxol, cloruro de magnesio, antitubulina, anti IgG-FITC, Tween 20, dodecil sulfato de sodio, seroalbúmina bovina (fracción V), reactivo de Folin Ciocalteu, trizma base, ácido cacodílico (sal sódica), kit para electroforesis [buffer electrodo 10X, buffer de muestra 2X, buffer concentrador, buffer separador, acrilamida, N,N'- metilen bis acrilamida(BIS), persulfato de amonio, lauril sulfato(SDS), solución de azul de bromofenol, 2-mercaptoetanol, solución de lauril sulfato 10%, TEMED y marcadores de peso molecular] de Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, USA). Tritón X-100 y Azul de Coomassie G-250 de Sigma de México.
- Rojo de fenol de Merck (Alemania). Sulfato de magnesio de Merck de México.

- Hidróxido de sodio, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, cloruro de sodio y ácido clorhídrico de Reactivos Monterrey
- Penicilina G-sódica 200,000 UI y sulfato de estreptomicina de Lakeside S.A. (México).
- Bicarbonato de sodio, tartrato de sodio y potasio, ácido acético, ácido clorhídrico y formaldehído de J.T. Baker de México.
- Medio McCoy 5A de Gibco Laboratories (Gran Island, N.Y., USA).
- Rollo fotográfico APX-25, 120, AGFAPAN de AGFA (USA).
- Cloruro de potasio de Técnica Química.
- Metanol de Control Técnico de Representaciones (México).
- Solución salina de Laboratorios Pisa (México)
- Acetato de uranilo, glutaraldehído de TED PELLA (USA).

3. Material Biológico

A. Vegetal

Las muestras de hojas, tallos verdes y corteza de *Taxus globosa* con una edad aproximada de 20 años, fueron recolectadas durante el mes de agosto, en el Parque Nacional “El Chico”, localizado a 10 Km al norte de la ciudad de Pachuca en el estado de Hidalgo por personal capacitado del Programa de Botánica, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México.

B. Cerebros

- *Cerebro de res*: se obtuvo del supermercado, se desconocía la fecha del sacrificio de los

animales, ya que se encontraban en estado de congelación

- *Cerebro de cerdo*: se compró a un distribuidor de carne “Carnes San Nicolas” Estos cerebros procedían de cerdos que eran sacrificados el mismo día que nos los suministraban de 5-7 horas después.

- *Cerebro de cabrito*: se compró en el mercado popular. Se utilizaron animales juvenes (1 mes), el cerebro se obtuvo inmediatamente después de sacrificar al animal, haciendo un corte transversal en la parte superior del cráneo, seguido por dos cortes verticales con el objeto de sacar en forma completa el cerebro; se le quitó el cerebelo, y las meninges con la ayuda de tijeras de disección, se lavó con solución salina fría y se mantuvo en baño de hielo.

C. Línea Celular:

- *Línea celular de ovario de hámster chino (CHO)*, auxótrofa de prolina, es una población clonal, originada de la clona BC1, que obtuvo Martínez-Rodríguez (1981) a partir de la cepa CCL61 (American Type Culture Collection, Maryland, USA) y se ha mantenido viable en nuestro laboratorio por más de 10 años en medio McCoy.

D. Suero bovino y suero de ternera.

Se obtuvo de sangre colectada en el rastro de la ciudad, el cual se pasó por una serie de filtros Millipore de 10 μ a 0.22 μ . Fue esterilizado por filtración a través de membranas con poros de 0.22 μ , distribuyéndolo en volúmenes de 40 o 100 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca. Después fue descomplementado por calentamiento a 56°C por 30 min. De cada botella se sembró 1 ml de suero en 10 ml de medio PEHPS (Said-Fernández et al. 1988) y se incubó por una semana para comprobar su esterilidad, luego fue almacenado a -20°C

IV. METODOS.

1. TRATAMIENTO DE LAS FRACCIONES DE *Taxus globosa*.

La obtención de éstas fracciones se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados, Montecillo Edo de Mexico por el Dr Marcos Soto Hernandez Las muestras previamente secadas en un horno a 60°C y molidas a un tamaño de partícula apropiado, se extrajo con metanol por 48 h a temperatura ambiente y con agitación Se filtró la parte soluble y el residuo se extrajo nuevamente con metanol por 24 h más. Se juntaron los extractos metanólicos y se concentró en un rotavapor Al extracto que se obtuvo se le agregó agua destilada y se extrajo con varias porciones de cloruro de metileno El extracto orgánico se concentró en un rotavapor, se pesó el residuo que se obtuvo y se continuó con el esquema de aislamiento de la fracción que contenga taxol, por cromatografía en capa fina, cromatografía en columna y finalmente por HPLC Esto se corroboró mediante análisis comparativo con un estándar de taxol con el mismo Rf en placa fina, así como el mismo tiempo de retención por HPLC. Estas fracciones se recibieron en el CIBIN en envases de vidrio con tapa de plástico en forma de residuos evaporados a sequedad indicándose el peso seco.

2. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES.

BUFFER DE POLIMERIZACIÓN. (MES 0.1 mM pH 6.5, MgCl₂ 0.5 mM, EGTA 1.0 mM). Se disolvió 23.04 g de MES y 380 mg de EGTA en 800 ml de agua desionizada, posteriormente se agregó 500 µl de MgCl₂ 1M (952.1 mg en 10 ml de agua desionizada p/v); se ajustó a pH 6.5 con HCl 1N y se aforó a 1000 ml con agua desionizada.

SOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE PROTEINAS TOI AL I.S

SOLUCIÓN ESTÁNDAR SAB 1mg/ml se disolvió 100 mg de seroalbumina bovina (Fraccion V) en 20 ml de agua desionizada con agitación lenta y se aforo a 100 ml con agua desionizada

SOLUCION A: se disolvió 25 g de carbonato de sodio y 500 mg de tartrato de sodio y potasio en aproximadamente 100 ml en agua desionizada, se agregó 125 ml de hidroxido de sodio y se aforó a 250 ml con agua desionizada. Se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente

SOLUCIÓN B: se disolvió 250 mg de sulfato de cobre y 500 mg de tartrato de sodio y potasio en aproximadamente 15 ml de agua desionizada, se le agregó 2.5 ml de hidróxido de sodio 1N y se completó el volumen a 22.5 ml con agua desionizada. Se guardó en frasco ambar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN C: se diluyó 1 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu con 15 ml de agua desionizada (se preparó inmediatamente antes de usarse)

SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS.

BUFFER CONCENTRADOR (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.7-6.9): se disolvió el contenido del frasco con 20 ml de agua desionizada con agitación y se aforó a un volumen de 40 ml agua desionizada. La solución se mantuvo a 4°C.

BUFFER SEPARADOR (Tris-HCl 3.0 M, pH 8.7-8.9): se disolvió el contenido del frasco con 20 ml de agua desionizada con agitación y se aforó a un volumen de 30 ml con agua desionizada. La solución se mantuvo a 4°C.

BUFFER ELECTRODO 10X: Se disolvió los contenidos de la botella de lauril sulfato y la de buffer electrodo en 200 ml de agua desionizada. Se agitó hasta completa disolución ajustando el volumen final a 2500 ml con agua desionizada. Se almacenó a 4°C.

BUFFER ELECTRODO 1X (Tris 0.025 M pH 6.8, Glicina 0.192 M y lauril sulfato 4%): a 35 ml de buffer 10 X se le agregó 315 ml de agua desionizada (cantidad suficiente para una corrida) Se preparó inmediatamente antes de usarse.

SOLUCIÓN ACRILAMIDA/BIS (N,N'-metilen bis acrilamida) 30%/2.7%: se disolvió el contenido del frasco marcado como acrilamida con 55 ml de agua desionizada, y se le adicionó el contenido del frasco marcado como N,N'-metilen bis-acrilamida (Bis), enjuagando con pequeñas cantidades de agua desionizada para remover las trazas de Bis. Una vez disuelto el Bis completamente en la solución de acrilamida, se aforó a 100 ml con agua desionizada. Se almacenó a 4°C.

SOLUCIÓN DE PERSULFATO DE AMONIO: se disolvieron 45 mg de cristales de persulfato de amonio en 3 ml de agua desionizada. Se preparó inmediatamente antes de usarse.

SOLUCIÓN DECOLORANTE: se mezclaron 400 ml de metanol, 70 ml de ácido acético glacial y 530 ml de agua desionizada. Se almacenó a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN REVELADORA: se disolvió 0.5 g de azul brillante en 500 ml de solución decolorante. Se almacenó a 4°C.

GEL SEPARADOR 10%: (cantidad suficiente para dos geles), la mezcla de las soluciones se realizó inmediatamente antes de usarse y en el orden que se menciona: solución acrilamida/Bis

3.3 ml, buffer separador 1.25 ml, solución de lauril sulfato 10% 100 μ l, agua desionizada 4.8 ml, solución de persulfato de amonio 1.5 % 500 μ l, TEMED 7.5 μ l.

GEL CONCENTRADOR 3.8% (cantidad suficiente para dos geles), la mezcla de las soluciones se realizó inmediatamente antes de usarse y en el orden que se menciona. solución de acrilamida/Bis 2.5 ml, buffer concentrador 1.25 ml, solución de lauril sulfato 10% 100 μ l, agua desionizada 5.65 ml, solución de persulfato de amonio 1.5 % 500 μ l, TEMED 10 μ l

SOLUCIÓN DE MUESTRA: en un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló 200 μ l de solución de tubulina 4 mg/ml con 200 μ l de buffer de muestra 2X, 20 μ l de 2-mercaptoetanol y 7 μ l de solución de azul de bromofenol. Posteriormente se sumergió en un vaso de precipitado con agua en ebullición por 3 min, se utilizó después de 5 min. Esta solución se conservó a -20°C

MEZCLA DE MARCADORES DE PESO MOLECULAR (anidrasa carbónica PM 29,000; Albúmina de huevo PM 45,000; Albúmina bovina PM 66,000; Fosforilasa β PM 97,410; β -Galactosidasa PM 116,000; Miosina PM 205,000): se diluyó el contenido del frasco con 1.5 ml de buffer de muestra 2X, 150 μ l de 2-mercaptoetanol y 10 μ l de solución de azul de bromofenol. Posteriormente se sumergió en un vaso de precipitado con agua en ebullición por 3 min, se utilizó después de 5 min. Esta solución se conservó a -20°C.

SOLUCIONES PARA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ESTABILIZADORA DE MICROTÚBULOS.

ESTÁNDAR DE TAXOL 10 mM: un frasco que contiene 5 mg de taxol se reconstituyó con 586 μ l de DMSO, se conservó a temperatura de 4 °C. A partir de esta solución se preparó las concentraciones utilizadas en las pruebas de polimerización.

SOLUCIÓN DE GTP 10 mM. se pesó 10.5 mg de GTP y se disolvió en 2 ml de agua desionizada, se conservó en frasco ámbar a temperatura de 4°C.

SOLUCIÓN DE CaCl₂ 10 mM: se disolvió 277.7 mg de CaCl₂ en 80 ml de agua desionizada y se aforó a 100 ml con agua desionizada.

SOLUCIONES PARA LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA:

SOLUCIÓN DE ANTIBIÓTICOS (100X):

Penicilina G-sódica 200,000U.I. y sulfato de estreptomina 0.5g. Los componentes se disolvieron en 100 ml de agua desionizada. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C en alícuotas de 10 ml en tubos estériles con tapón de rosca 16 X 100 mm, Pyrex.

TRIPSINA AL 2.5%. Se disolvió 2.5 g de tripsina en 100 ml de agua desionizada estéril y se agitó suavemente toda la noche a 4°C con un agitador magnético. La solución se filtró por papel Whatman No. 1 en un embudo Buchner y luego se esterilizó por filtración y se almacenó a -20°C, en alícuotas de 10 ml.

TRIPSINA AL 0.25%. Se mezcló 10 ml de tripsina al 2.5% en un vaso de precipitado con 0.6 ml de rojo de fenol al 1%, 1 ml de la solución de antibióticos (100X) y 90 ml de Amortiguador de pH isotónico de Tris (BT). Enseguida se esterilizó la solución por filtración y se almacenó a -20°C en porciones de 5 ml. Se incubó un tubo de cada lote, elegido al azar, por tres días a 36°C para comprobar su esterilidad.

SOLUCIÓN DE ROJO DE FENOL AL 1%. Se disolvió 1.0 g de colorante en 6 ml de NaOH 1N y se aforó a 100 ml con agua desionizada. La solución se filtró en papel Whatman No 1 y luego se almacenó a -20°C en un frasco de borosilicato con tapón de rosca.

BT (AMORTIGUADOR DE PH ISOTÓNICO DE TRIS): 8 g de NaCl, 3.75 g de KCl, 0.1 g de Na_2HPO_4 , 3.0g de trizma base pH 7.4 - 7.5. Los componentes se disolvieron en 90 ml de agua desionizada, se les añadió 30 ml de HCl 1N, se aforó a un volumen de 1000 ml con agua desionizada. Se esterilizó en autoclave, se distribuyó en alícuotas de 100 ml, en botellas con tapón de rosca, y se almacenó a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS): NaCl 6.5 g; K_2HPO_4 2.8 g; KH_2PO_4 0.5 g. Los componentes se disolvieron en 900 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 7.4-7.5 con NaOH 10N, la solución se aforó a 1000 ml con agua desionizada, se esterilizó en autoclave y se almacenó en alícuotas de 100 ml a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN DE PBS, EDTA 10mM, MnCl_2 2mM, a pH 6.9: los componentes de la solución PBS y 3.72g de EDTA se disolvieron en 900 ml de agua desionizada y se le agregó lentamente y con agitación constante 251.8 mg de MnCl_2 , se ajustó el pH a 6.9 con NaOH 10N y se aforó a 1000 ml.

SOLUCIÓN DE PBS, MnCl_2 2mM: los componentes de la solución PBS se disolvieron en 900 ml de agua desionizada y se le agregó lentamente con agitación constante el MnCl_2 (3.72 g disueltos en 50 ml de agua desionizada), la solución se aforó a 1000 ml.

SOLUCIÓN PBS CON 0.1% DE FORMALDEHÍDO Y 0.5% DE TRITÓN X-100. A 90 ml de solución de PBS se le agregó 100 μ l de formaldehído y 500 μ l de Tritón X-100 y se aforó a 100 ml con PBS.

SOLUCIÓN DE PBS, $MnCl_2$ 2mM, TWEEN 20 AL 0.1%. A 99.9 ml de la solución anterior se le agregó 0.1 ml de tween 20 y se agitó hasta disolverse.

SOLUCIONES PARA MICROSCOPIA.

BUFFER DE CACODILATO DE SODIO 0.1 M pH 7.4. Se disolvió 1.6g de cacodilato de sodio en 50 ml de agua tridestilada se ajustó el pH a 7.4 y se aforó a 100 ml con agua tridestilada.

SOLUCIÓN DE GLUTARALDEHÍDO AL 1%. Se disolvió 1ml de glutaraldehído en 99 ml de buffer de cacodilatos pH 7.4.

SOLUCIÓN DE ACETATO DE URANILO AL 2% en agua tridestilada p/v.

3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MCCOY.

Las concentraciones de las soluciones madre se indican con un número seguido de una X. Las soluciones se elaboraron con agua desionizada (desionizador Synbron/Barstead Co. Div. of Synbro Corporation, Boston, Ma., USA.)

PREPARACIÓN DE MEDIO BASAL MCCOY (SOLUCIÓN DE TRABAJO 1X).

Se disolvió 12 g de medio en polvo McCoy 5A modificado en 800 ml de agua desionizada, añadiendo 2.2 g de $NaHCO_3$ y 10 ml de la solución de antibióticos 100X. El pH se ajustó a 6.8 con HCl 1N y se aforó a 1000 ml con agua desionizada. La solución se esterilizó por filtración a través de membranas de nitrocelulosa, poros de 0.22 μ (Millipore Corporation, Bedford, MA.,

USA), distribuyó el medio en volúmenes de 85 ml en botellas estériles de borosilicato con tapón de rosca. El medio se incubó por una semana a 36°C para probar su esterilidad y luego se almacenó a 4°C. El medio McCoy quedó completo al añadirle asépticamente 15 ml de suero de ternera a botellas con 85 ml del medio basal (solución de trabajo 1X); se usó inmediatamente o se almacenó a 4°C.

4. OBTENCIÓN DE TUBULINA A PARTIR DE CEREBRO (Shelanski et al 1973)

PROCEDIMIENTO:

- a) El cerebro se pesó y se homogeneizó adicionando buffer de polimerización, en una relación 750 ml/kg de peso de cerebro.
- b) El homogeneizado se centrifugó a 11,000 Xg por 20 min a 4°C, el precipitado se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 40,000 Xg por 30 min a 4°C. El precipitado se desechó y al sobrenadante (*) se le agregó un cuarto de glicerol (v/v) y GTP 0.1 mM, posteriormente se incubó a 37°C por 60 min con agitación de 100 rpm para inducir la polimerización.
- c) La solución se centrifugó a 40,000 Xg por 30 min a 37°C, el sobrenadante se desechó y la pastilla formada se resuspendió en 2 ml de buffer de polimerización, se colectaron las fracciones en un vaso, se homogeneizaron y se incubaron en un baño de hielo por 60 min para inducir la depolimerización. posteriormente se centrifugó la solución a 40,000 Xg por 30 min a 4°C (**).
- f) El precipitado se desechó y con el sobrenadante se repitió el ciclo a partir de (*) hasta (**).
- g) Al sobrenadante se le añadió 1/4 de glicerol (v/v) y se guardó en fracciones de 500 a 1000 µl a -80°C. Ver diagrama de flujo figura 3.

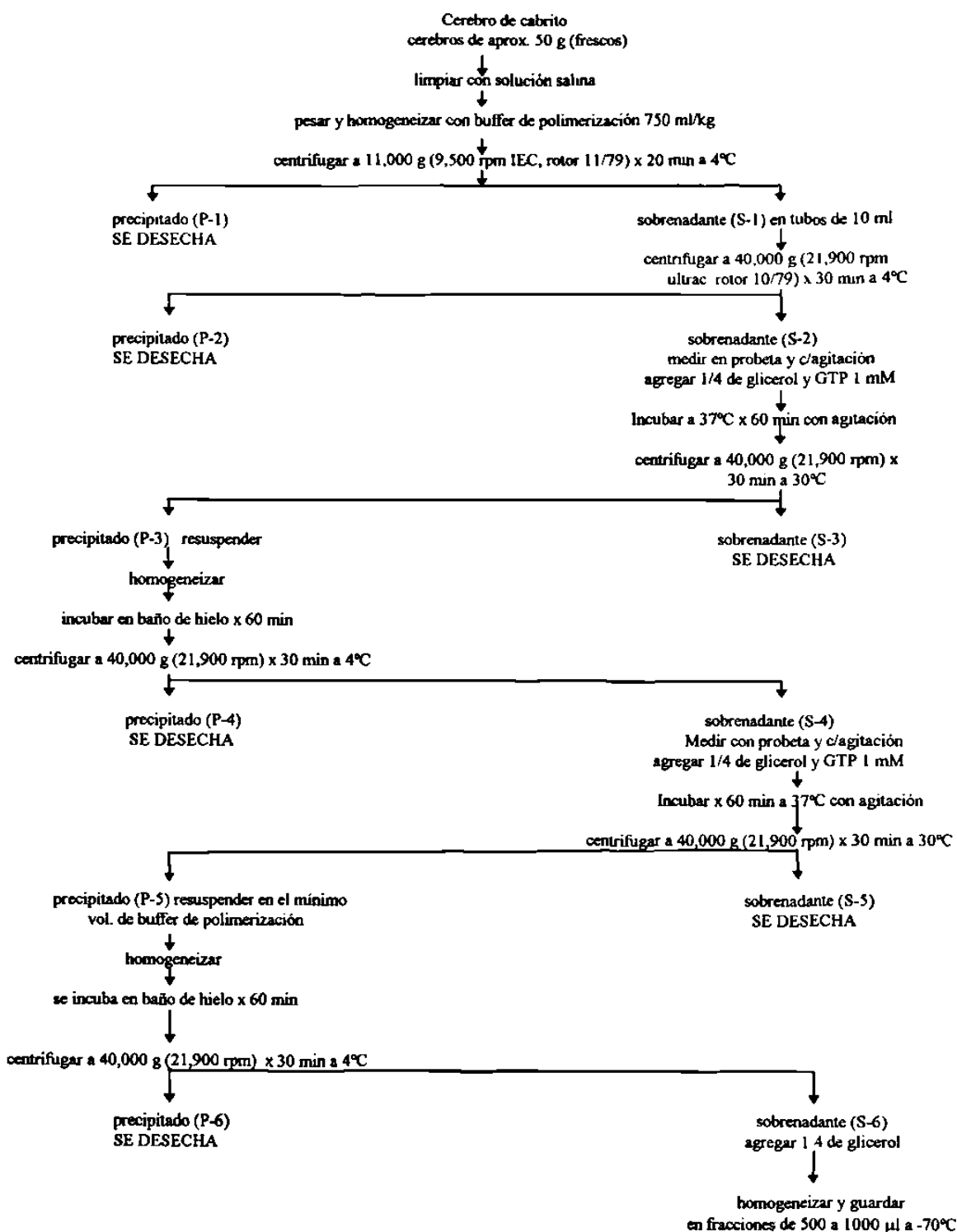


Figura No. 3. Diagrama de flujo de la obtención de tubulina a partir de cerebro.

5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE HARTREE (Hartree, 1972).

PROCEDIMIENTO:

a) Se colocó por duplicado las siguientes soluciones: solución estándar SAB 50, 100, 150, 200, y 250 μl ; muestra 25 y 50 μl ; agua desionizada (como blanco) 250 μl . Se completó el volumen de los tubos a 250 μl con agua desionizada

b) Se adicionó 200 μl de la solución A a cada uno de los tubos, se agitaron y se incubaron en un baño de agua a 50°C por 10 min. Se dejaron enfriar a T.A. por 12 min.

c) Se les agregó 20 μl de la solución B, se agitaron y se dejaron reposar 10 min a T.A.

d) Se agregó 700 μl de la solución C, se agitaron y se incubaron en un baño de agua a 50°C.

Se dejó enfriar a T.A. por 10 min (Tabla 1).

e) A continuación se colocó 200 μl del contenido de cada uno de los tubos en la microplaca iniciando en la posición A1 con el blanco, enseguida por duplicado las soluciones del estándar de menor a mayor concentración, y por último las muestras en la misma forma.

f) La placa se introdujo en el lector de microplacas, el cual se programó con las siguientes condiciones:

Filtro de luz	-----	492 nm
Método	-----	regresión lineal
Coordenadas	-----	Y= absorbancias, X= concentración
Calibrador	-----	50, 100, 150, 200, 250
Calibrador y muestras	-----	leer por duplicado

Tabla No. 1. Determinación de proteínas por el método de Hartree modificado para el uso de microplacas (micrométodo).

Agua desionizada μl	Estándar SAB μl	Sol. A μl	10 min 50°C	12 min T.A.	Sol. B μl	10 min T.A.	Sol. C μl
250	BLANCO	200	✓	✓	20	✓	700
200	50	200	✓	✓	20	✓	700
150	100	200		✓	20	✓	700
100	150	200	✓	✓	20	✓	700
50	200	200	✓	✓	20	✓	700
--	250	200	✓	✓	20	✓	700
Tubulina 50	200	200	✓	✓	20	✓	700
Tubulina 100	150	200	✓	✓	20	✓	700

6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS. (Laemmli et al. 1970).

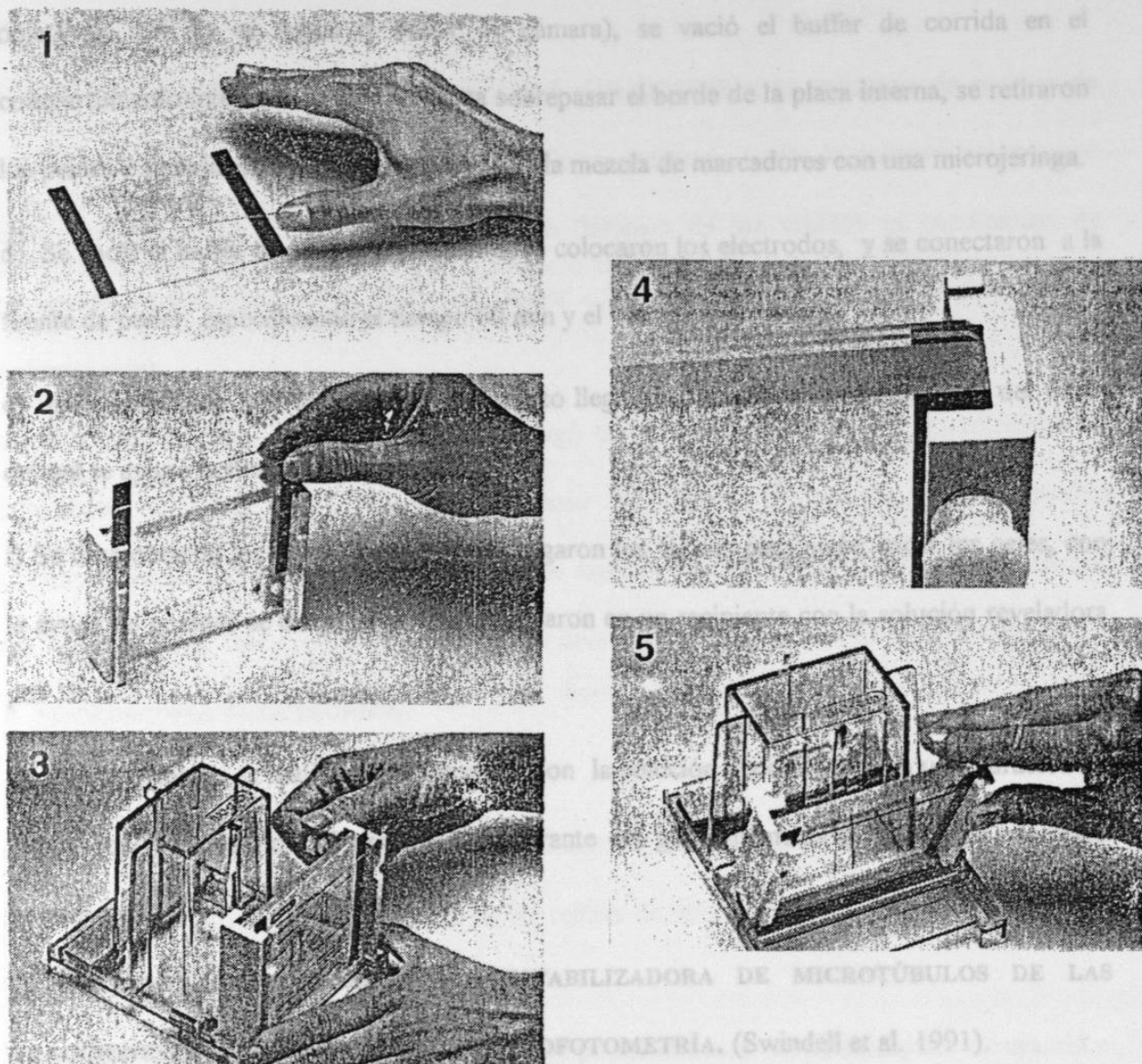
PROCEDIMIENTO:

a) Se utilizó el equipo Bio-Rad para electroforesis: se prepararon las cámaras para elaborar los geles, colocando dos placas de vidrio de diferente altura (10 x 8.3 y 10 x 7.3 cm) separadas por dos espaciadores y se introdujeron en el portaplacas como se indica en la figura 5, se alinearon y se sujetaron apretando los tornillos del portaplacas.

b) A continuación se colocó 3.4 ml de solución del gel separador (inmediatamente después de prepararlo) en forma rápida entre las dos placas de vidrio y se agregó una pequeña cantidad de agua desionizada con el objeto de que quede cubierta la superficie, para dar una terminación homogénea a la parte superior del gel separador. Se dejó reposar de 10 a 15 min para permitir que se polimerice.

c) Posteriormente se inclinó el portaplacas para eliminar el agua sobrante, y se agregó la solución del gel concentrador (inmediatamente después de prepararlo) en forma rápida sobre el gel separador adicionando solución hasta el borde superior de la placa de vidrio más pequeña y se colocó el peine que sirvió como guía para hacer las hendiduras o celdas donde se colocaron las muestras. Se agregó una pequeña cantidad de agua desionizada de tal forma que quedó cubierta la superficie para dar una terminación homogénea a la parte superior del gel concentrador.

c) Completada la polimerización de los dos geles, las dos placas se colocaron en el dispositivo que se introdujo en la cámara de electroforesis (cuidando que queden bien selladas con el



El sistema base que se utilizó para medir la actividad estabilizadora de microtúbulos fue el siguiente:

Figura No. 4.- Procedimiento para utilizar el equipo de electroforesis. 1) Colocación de los espaciadores entre los vidrios. 2 y 3) Montaje de las placas en el soporte. 4) Ajuste y nivelación de las placas. 5) Preparación para su llenado.

objeto de que no se fugue el buffer de cámara), se vació el buffer de corrida en el compartimiento interno de las placas hasta sobrepasar el borde de la placa interna, se retiraron los peines y se aplicaron 10 μ l de la muestra y la mezcla de marcadores con una microjeringa.

d) Se vació el buffer de corrida a la cámara, se colocaron los electrodos, y se conectaron a la fuente de poder, especificando el tiempo 60 min y el voltaje 150 volts.

e) En el momento que el frente de corrimiento llegó aproximadamente 1 cm antes del final del gel se apagó la fuente de poder.

f) Se desmontaron los porta placas y se despegaron los vidrios para poder sacar los geles, con la ayuda de guantes se despegaron y se colocaron en un recipiente con la solución reveladora por 1h.

g) Posteriormente se realizaron tres lavados con la solución decolorante con una duración de 30 min c/u para eliminar el exceso de colorante del gel, finalmente se pasó a la solución conservadora.

7. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ESTABILIZADORA DE MICROTÚBULOS DE LAS FRACCIONES DITERPÉNICAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA. (Swindell et al. 1991).

El sistema base que se utilizó para medir la actividad estabilizadora de microtúbulos fue el siguiente:

Solución de tubulina no polimerizada ----- X μ l para tener 1.5 mg/ml

Soluciones de: taxol o Frac. *T. globosa* o GTP ----- 100 μ l

Buffer de polimerización ----- cbp 800 μ l

PROCEDIMIENTO:

- a) Se colocó el buffer de polimerización y la solución de tubulina no polimerizada en la celda del espectrofotómetro, se agitó hasta homogeneizar y utilizando buffer de polimerización como blanco se determinó la absorbancia a 350 nm (lámpara de luz visible) en condiciones de temperatura constante a 37 °C (Un valor menor a 0.1 nos corrobora que la tubulina no esta polimerizada).
- b) Sin sacar la celda del espectro se le agregó en forma rápida con una microjeringa las soluciones de: taxol o fracciones *T. globosa* o GTP y se tomó la primera lectura correspondiendo al tiempo cero. Las lecturas se siguieron registrando cada minuto. Al minuto 29.5 se agregaron 100 µl de CaCl₂ 10 mM y se continuó con las lecturas hasta el minuto 40.

8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**PROCEDIMIENTO:**

- a) Se tomaron 10 µl de cada una de las soluciones de la prueba de polimerización al minuto 29.15 y al minuto 40 y se colocaron en las rejillas de cobre (de 400 mallas, cubiertas con formvar y carbón).
- b) Se les adicionó 10 µl glutaraldehído al 1%, y posteriormente 10 µl de acetato de uranilo al 1 %.
- c) Las rejillas se analizaron en el microscopio electrónico Zeiss, EM109.

9. CULTIVO DE CÉLULAS DE LA LÍNEA CHO.

RESIEMBRA Y MANTENIMIENTO.

El medio de cultivo se retiró asépticamente por succión de las botellas de 25 cm², donde estaban creciendo las células. Se le añadió 1 ml de tripsina 0.25% y se incubaron los cultivos por 5 min a 36°C. Después la suspensión de células se transfirió a tubos cónicos graduados con tapón de rosca. Los cultivos se lavaron dos veces con SSB centrifugando a 600 Xg por 5 min. Se resuspendió el sedimento celular con 5 ml de medio fresco y se contaron las células en un hemocitómetro. Se sembró 1 X 10³ células por ml en botellas nuevas, a las cuales se les añadió 4 ml de medio McCoy y se incubó a 36°C, en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%.

cada siete días. Los cultivos de la resiembra anterior se conservaron hasta comprobar el crecimiento y la ausencia de contaminación en los cultivos recientes. La cepa de referencia se mantuvo resemebrando las células a dos botellas de 25 cm².

CRIOPRESERVACIÓN DE LAS CÉLULAS.

Las células se cosecharon en tubos cónicos graduados como se describió anteriormente. El sedimento celular se resuspendió en un volumen de medio McCoy completo con 10% de dimetilsulfóxido y se ajustó la suspensión celular a una concentración de 1 X 10⁶ células por mililitro. Las células fueron colocadas en tubos estériles de polipropileno de 2 ml de capacidad (A/S Nunc, CA USA) y congeladas sucesivamente a -20°C por 2-3 h, a -70°C por 2-3 h y por último se almacenaron a -196°C en nitrógeno líquido.

Para la descongelación se tomó un tubo con células congeladas y se pasó directamente a 36°C en baño María para descongelado rápido. El contenido se colocó en dos botellas de 25 cm² y se

le agregó 4 ml de medio McCoy completo. A las cuatro horas se cambio el medio de cultivo para eliminar el dimetilsulfóxido.

10. INMUNOFLUORESCENCIA .

PROCEDIMIENTO:

- a) Del cultivo de células de la línea CHO en fase logarítmica de crecimiento: se retiró el medio de cultivo de las botellas de 25 cm² donde estaban creciendo las células asépticamente por succión. Se le añadió 1 ml de tripsina 0.25% y se incubaron los cultivos por 5 min a 36°C. b) La suspensión de células se transfirió a tubos cónicos, graduados con tapón de rosca. Los cultivos se lavaron dos veces con SSB centrifugando a 600 Xg por 5 min. Se resuspendió el sedimento celular con 5 ml de medio fresco, se contaron las células en un hematocitómetro, y se diluyeron en medio completo para tener una concentración celular de 100,000 células/2 ml.
- c) Se adicionó 2ml de medio McCoy completo, conteniendo 100,000 células CHO provenientes de un cultivo en fase exponencial a tubos de Leighton con laminillas de 25 X 5 mm y tapón de rosca.
- d) A las 72 horas de crecimiento se les agregó por separado y por duplicado: 100 µl de las fracciones de *T. globosa* 1 µM (p/v en DMSO), 100 µl de taxol 1.0 µM y 100 µl de DMSO.
- e) Los tubos se incubaron por una hora en cámara húmeda y ambiente de CO₂.
- f) Al término de la incubación se inició el proceso de marcaje con antitubulina: las células se lavaron con PBS, MnCl₂ 2 mM pH a 6.9. Se fijaron con formaldehído al 0.1 % en PBS + 0.5 % Tritón X-100 por 10 min a temperatura ambiente. Se lavaron por 10 min con PBS, MnCl₂

2 mM. Posteriormente las células se incubaron a 37 °C con antitubulina de conejo diluida 1/50 en PBS, $MnCl_2$ 2 mM por 25 min en cámara húmeda. Al término de la incubación se lavó por 5 min con PBS, $MnCl_2$ 2 mM, Tween 20 0.1 %.

g) Se agregó antitubulina con anti-IgG de conejo conjugada con fluoresceína.

h) Con ayuda de unas pinzas se sacó la laminilla y se colocó sobre un portaobjetos teniendo cuidado de que la monocapa de células quede hacia abajo. Al portaobjetos se le adicionó previamente una gota de propidio de iodo 0.1 $\mu g/ml$ en PBS, $MnCl_2$ 2 mM como contrastante.

i) Se observó al microscopio de epifluorescencia.

V. RESULTADOS.

1.- OBTENCIÓN DE FRACCIONES RICAS EN DITERPENOIDES.

De los extractos obtenidos a partir de corteza, hojas y tallos verdes, se separaron las fracciones diterpénicas donde se identificó al taxol como principal componente en base a los R_f obtenidos en la cromatografía en capa delgada y a los tiempos de retención en la cromatografía de líquidos de alta presión.

Los porcentajes encontrados en peso seco en relación al estándar de taxol fueron los siguientes: corteza 0.0085%, hojas 0.013%, y tallos verdes 0.004% (Tabla 2).

2.- OBTENCIÓN DE TUBULINA.

Debido a que la tubulina no se puede adquirir comercialmente fue necesario montar la técnica de obtención a partir de cerebro.

Se inició con: a) cerebro de res congelado obtenido del supermercado, los resultados no fueron satisfactorios debido a que los cerebros utilizados eran de animales sacrificados con anterioridad y no se tenía el control del tiempo transcurrido entre el sacrificio, la obtención del cerebro y su congelación. No se logró obtener tubulina probablemente por estar ya degradada, por lo que se continuó con: b) cerebro de cerdo obtenido a través de un distribuidor de carnes aproximadamente 5 h después de haberse sacrificado al animal, con éste si se logró obtener tubulina, sin embargo había mucha variación entre el tiempo de sacrificio y la entrega del cerebro, lo que ocasionaba que fuera muy variable la cantidad de tubulina obtenida, dado que ésta variable no la podíamos controlar; se realizó entonces con: c) cerebro de cabrito (6-8 semanas de edad), el cabrito fue entregado en nuestras instalaciones, se sacrificó e inmediatamente después del sacrificio se procesó. El peso de los cerebros utilizados estuvo en el rango de 40-60 g, la cantidad de proteína total en el último paso del método de obtención de tubulina se determinó por el método de Hartree obteniéndose un rendimiento de 0.7-1.0 mg/g de cerebro.

Tabla No. 2.- Porcentaje de taxol determinado por cromatografía en capa delgada de las fracciones obtenidas a partir de extractos de hojas, tallos y corteza de la especie mexicana *Taxus globosa*.

HOJAS	0.013 %
CORTEZA	0.008 %
TALLO	0.004 %

La electroforesis se realizó en gel de Acrilamida/Bisacrilamida/SDS, se realizó primeramente utilizando una concentración del gel de 15%, pero no se lograba una buena definición de las bandas por lo que se varió la concentración hasta quedar en 10% obteniéndose una buena separación de las dos bandas que corresponden a tubulina alfa y beta (fig.5). En la fig. 6 se observan las dos bandas de tubulina obtenidas al final del proceso de purificación, después de los dos ciclos de polimerización-depolimerización.

3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTABILIZADORA DE MICROTÚBULOS POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO .

En la gráfica No 1 se observa la cinética de polimerización de la tubulina al agregar el GTP 1mM aumenta la absorbancia con respecto al tiempo, alcanzando un máximo valor de 0.144 de D.O. y después se mantiene la polimerización hasta el minuto 30 donde se agrega el CaCl_2 1mM el cual es un desestabilizador de microtúbulos por lo que la curva sufre una caída hasta 0.076 de D.O. sin presentar recuperación. Por otra parte se observa la cinética de polimerización de la tubulina al agregar el taxol 50 μM donde se observa que promueve el ensamble de tubulina en ausencia de GTP, el cual es normalmente requerido (Schiff. 1981; Carlier 1983), alcanzando un máximo valor de 0.160 de D.O. manteniéndose la polimerización hasta el minuto 30 donde se agrega el CaCl_2 1mM observándose una caída ocasionada por la acción desestabilizante de los iones Ca^{++} hasta 0.122 D.O., pero la acción desestabilizante es superada por el taxol ya que se puede apreciar la acción de recuperación al iniciarse un aumento en la D.O. También se observa la cinética de polimerización de la tubulina al agregar la fracción obtenida a partir de corteza de *Taxus globosa*, la cual también promueve el ensamble de tubulina en ausencia de GTP, alcanzando un máximo valor de absorbancia de 0.177 de D.O., observándose una caída ocasionada por la acción desestabilizante de los iones Ca^{++} hasta 0.152 de D.O. seguida de una recuperación de la polimerización.

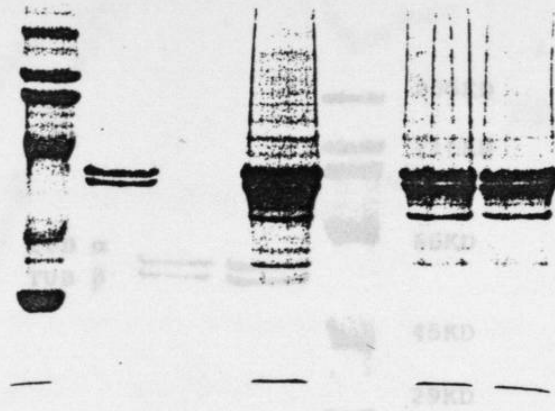


Figura No. 6.- Electroforesis de la tubulina purificada. Se observan

Figura No. 5.- Patrón electroforético de diferentes etapas del proceso de extracción de tubulina. 1) Marcadores de peso. 2) Fracción S-6. 3) Fracción P-5. 4 y 5) Fracción S-4 peso.

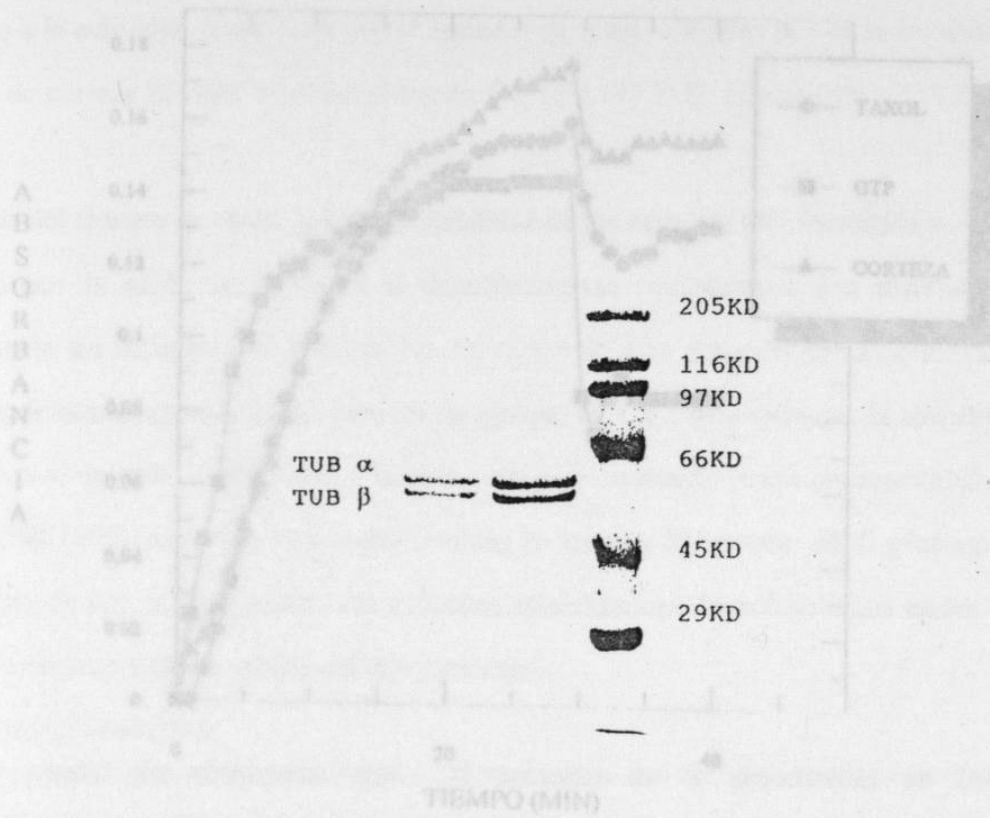
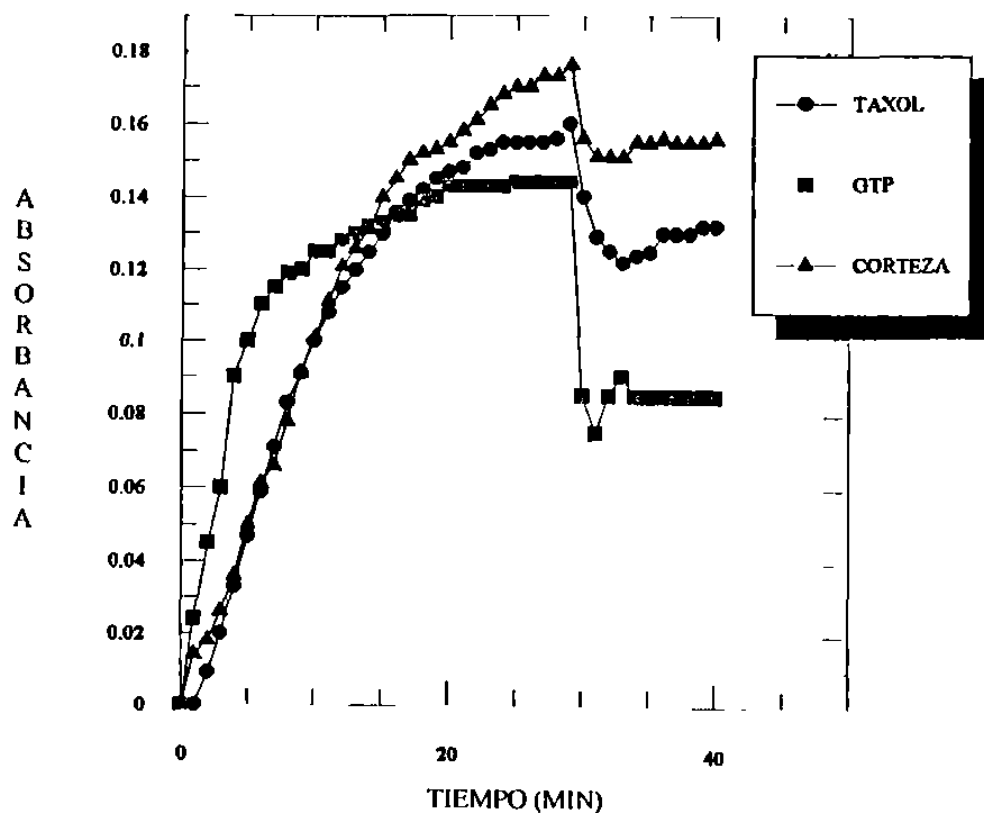


Figura No. 6.- Electroforesis de la tubulina purificada. Se observan las bandas α y β correspondientes a los monómeros de tubulina. En la última columna se muestran los marcadores de peso.



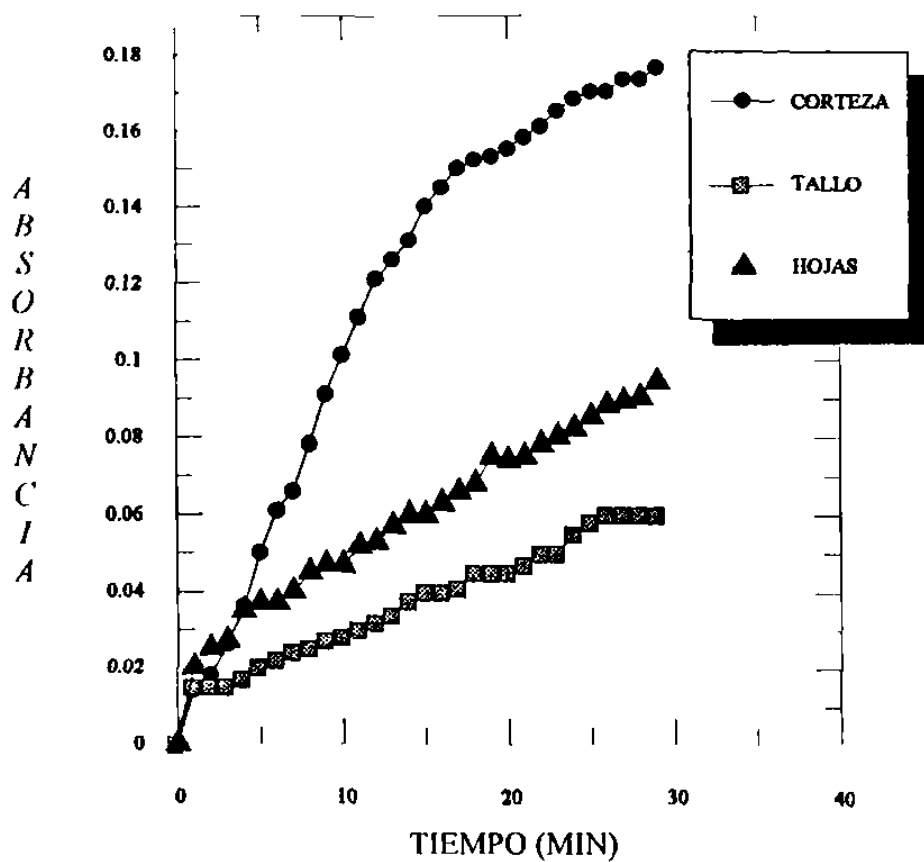
Gráfica No. 1.- Curva de polimerización de tubulina en presencia de:(a) GTP, (b) taxol, y (c) fracción de corteza de *T. globosa*.

En la grafica No 2, se observan los resultados de polimerización en ausencia de GTP de las tres fracciones obtenidas a partir de *T. globosa*. En la fracción obtenida a partir de hojas el valor máximo obtenido en la cinética de polimerización es de 0.095 de D.O. equivalente 59.4% con respecto a la actividad presentada por el estándar de taxol. En la fracción obtenida a partir de tallo se obtuvo un valor máximo de absorbancia de 0.060 D.O. equivalente a 37.5% con respecto a la actividad presentada por el estándar de taxol; mientras que en la fracción obtenida a partir de corteza el valor máximo obtenido fue de 0.177 D.O. equivalente a 110.65% (Tabla 3).

El efecto del cloruro de calcio sobre la estabilidad de los microtúbulos formados por el GTP se observó por la caída de la curva al depolimerizarse originándose una disminución en la absorbancia sin recuperación (gráfica No 1), contrario a lo obtenido en la polimerización del taxol, en donde se aprecia como después de agregar el Ca^{++} se disminuye la absorbancia pero se inicia nuevamente un aumento y de ésta manera bloqueando la acción desestabilizadora del Ca^{++} (Shiff 1979). Esto fue observado también en las tres fracciones de *T. globosa* probadas resultando de ésta manera positiva la actividad estabilizadora de microtúbulos en las fracciones de hojas, corteza y tallos verdes del tejo mexicano.

4. MICROFOTOGRAFÍAS.

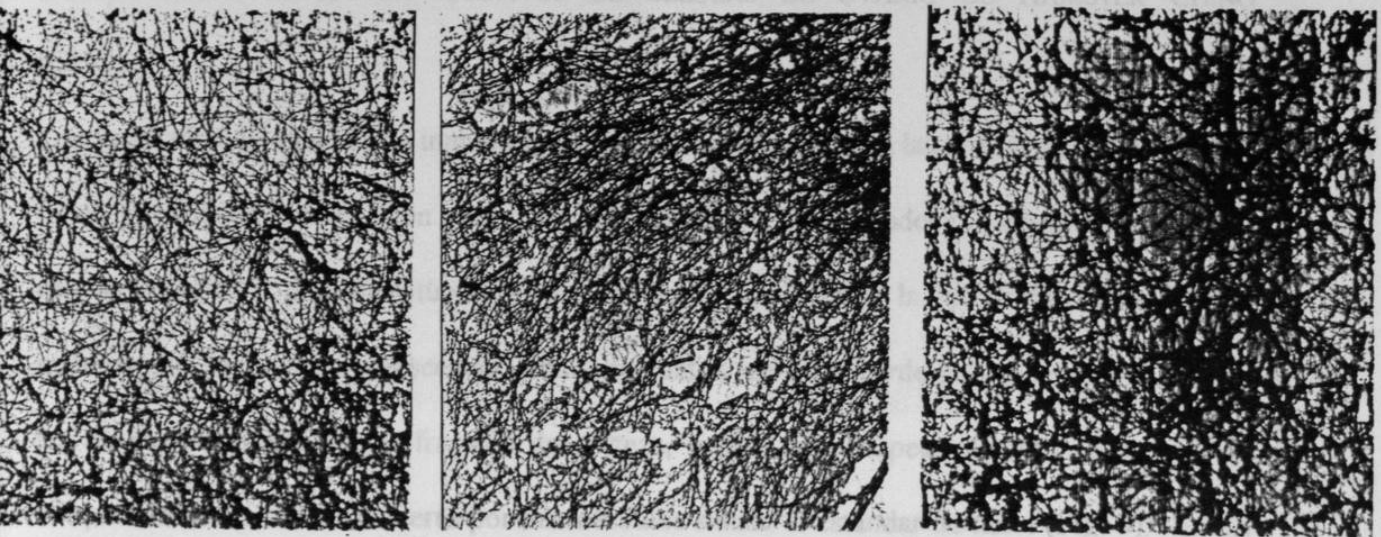
Con el objeto de comprobar que el aumento de la absorbancia en las pruebas espectrofotométricas de polimerización fue debido a la formación de microtúbulos y no un fenómeno de turbidez, se tomaron muestras antes de la prueba y a los 30 min de iniciada después de haber agregado el agente desestabilizador de microtúbulos; esto se corroboró con las imágenes obtenidas ya que no se observaron microtúbulos en las muestras tomadas al inicio de la prueba, pero 30 min después de la incubación con las fracciones se comprobó la presencia de microtúbulos (fig. 7).



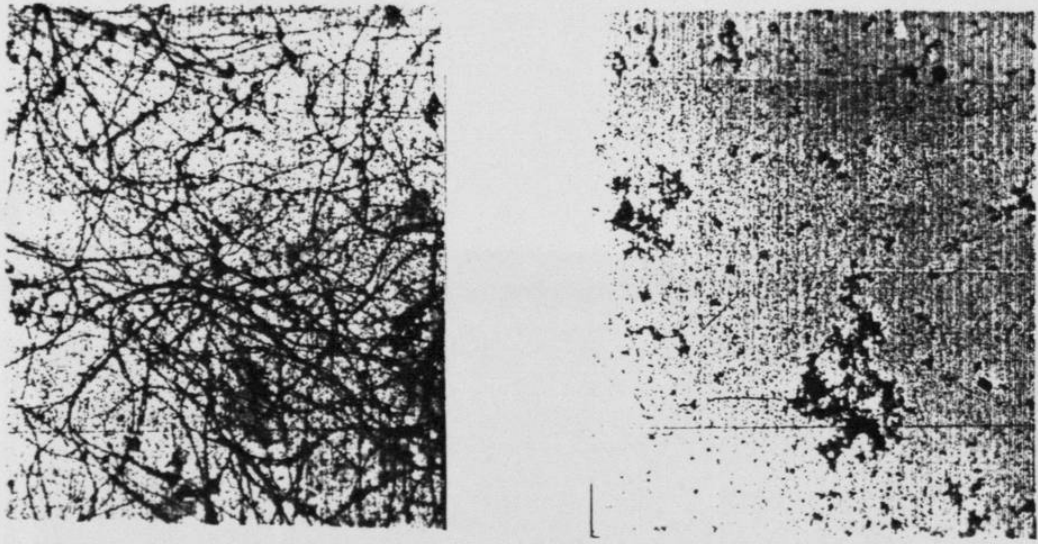
Gráfica No. 2.- Curva de polimerización de tubulina en presencia de las fracciones de hojas, tallos y corteza de *T. globosa*.

Tabla 3.- Porcentaje de actividad de taxol de las fracciones obtenidas a partir de extractos de hojas, tallos y corteza de la especie mexicana *Taxus globosa*, determinado por la actividad de polimerización de tubulina.

CORTEZA	110.6 %
HOJAS	59.4 %
TALLO	37.5 %



células incubadas solo con el vehiculo (DMSO) b marcaje de la tubulina fue significativamente menor que en los cultivos incubados con taxol o las fracciones estudiadas del *T. globosa* (Fig 10)



d e

Figura No. 7.- Microfotografías de tubulina en presencia de a) GTP 10 mM, b) taxol 50 μ M, c) fracciones de corteza de *T. globosa*, d) fracciones de tallo de *T. globosa*, e) tubulina sin polimerizar. Aumento 3000X.

5. ACTIVIDAD POLIMERIZADORA DE MICROTÚBULOS POR EL MÉTODO DE INMUNOFLUORESCENCIA EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE OVARIO DE HAMSTER CHINO (CHO).

Los resultados del método de inmunofluorescencia muestran que en las células incubadas con el taxol, se produce una reacción intensa de polimerización, observándose el citoplasma de éstas células cubierto por microtúbulos como se puede apreciar en la fotografía tomada en el microscopio de inmunofluorescencia, como conjuntos de color verde fluorescente (Fig. 8) En las células incubadas con la fracción de corteza, hoja y tallo respectivamente se observó el citoplasma de las células cubierto por microtúbulos similar al estándar de taxol (Fig. 9). En las células incubadas solo con el vehículo (DMSO) el marcaje de la tubulina fue significativamente menor que en los cultivos incubados con taxol o las fracciones estudiadas del *T. globosa* (Fig 10).

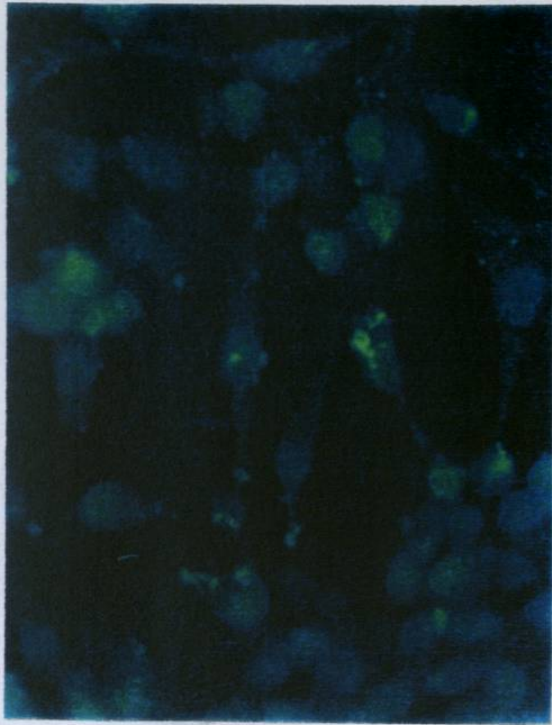


Figura 8.- Microfotografías de células de la línea CHO en presencia de taxol y Anti-IgG-FITC.

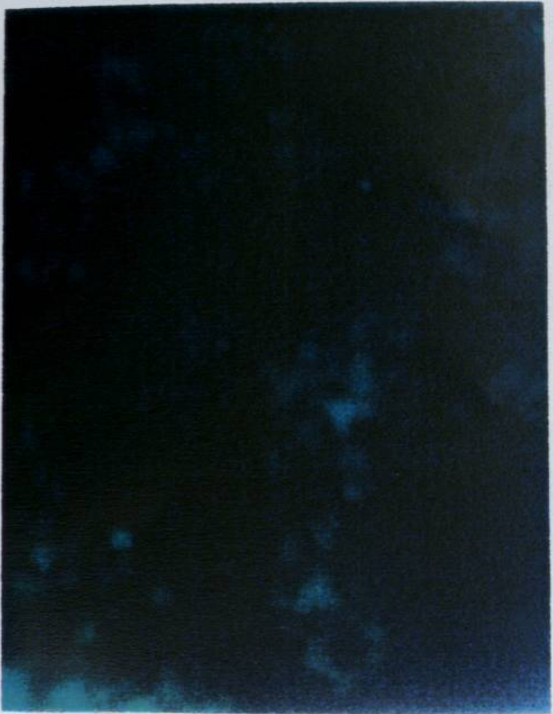


Figura 9.- Microfotografías de células de la línea CHO en presencia de DMSO (vehículo) y Anti-IgG-FITC.

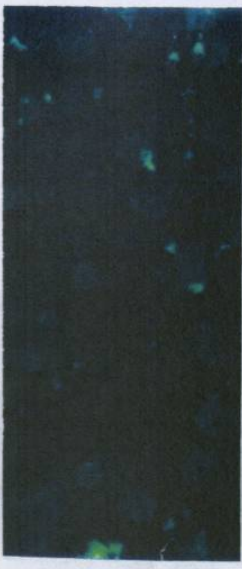
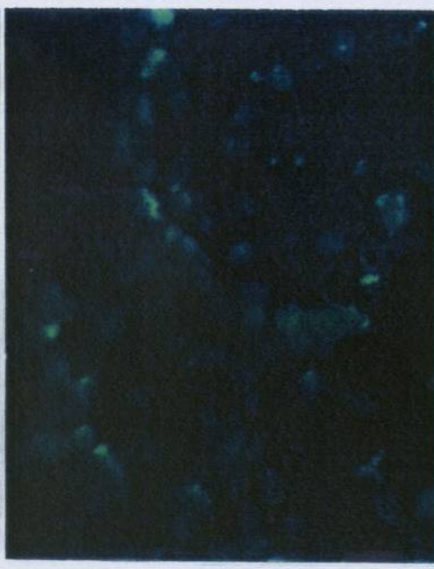
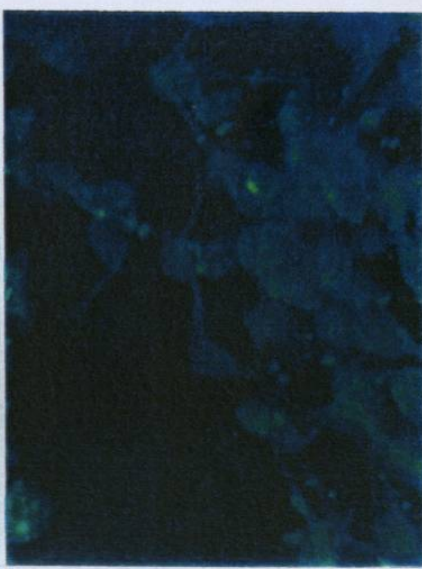


Figura 10.- Microfotografías de células de la línea CHO en presencia de fracciones de hojas, tallos y corteza de *Taxus globosa* y Anti-IgG-FITC.

VI. DISCUSIÓN.

Dos siglos atrás, la medicina contaba con un número limitado de drogas. La farmacología ha tenido un gran avance desde entonces, ya que los farmacólogos tienen ahora a su disposición compuestos puros de probada eficacia, sin embargo no hay que perder de vista que la gran mayoría de ellos provienen de productos naturales y que el descubrimiento científico de los mismos fue el resultado del uso etnobotánico. Muchas investigaciones de etnofarmacología son necesarias para tener un camino más eficiente en el descubrimiento de nuevas drogas, el cual se realiza por medio de tamizajes al azar de una cantidad determinada de plantas (Farnsworth, 1981). Además de que a partir de éstas drogas, se han derivado drogas más activas, ya que los químicos pueden hacer modificaciones sobre estructuras ya conocidas, sin embargo a pesar de esto muchas especies son extintas como resultado de la destrucción de éstas plantas debido al uso irracional de los mismos.

Como resultado de uno de éstos tamizajes (Wall et al. 1995) fue descubierto el taxol (Tabla 4). El diterpenoide taxol fue aislado de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* o tejo americano (Wani et al. 1971), encontrado en el pacífico norte inmerso en bosques de coníferas, es de lento crecimiento, requiere de más de cien años para alcanzar su madurez. Debido a la importante actividad antineoplásica del taxol, ha despertado un gran interés para su aplicación en la clínica, sin embargo el problema principal es que no se cuenta con cantidades suficientes de taxol, puesto que la fuente actual es un recurso no renovable.

Por lo que la búsqueda de nuevas fuentes de taxol se ha intensificado, en base a esto se realizó el presente trabajo, se consideró al tejo mexicano o *Taxus globosa* como un buen candidato

Tabla No. 4.- Cronología del taxol desde su identificación hasta su aplicación clínica.

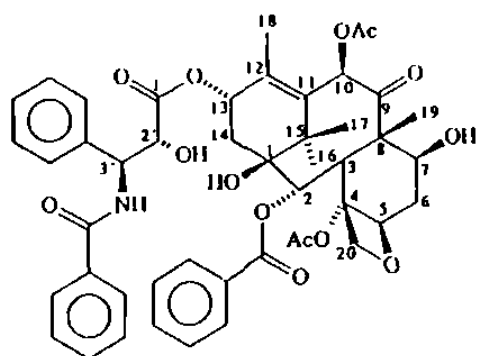
Estudio de <i>T. brevifolia</i> en tamizaje efectuado por parte del NCI	1960
Aislamiento, definición de estructura química, actividad en P388 y L210	1971
Actividad en un panel de sistemas de tumores	1975-1976
Desarrollo preclínico	1977
Mecanismo de acción	1979
Toxicología en animales	1982
Ensayos de fase I	1983-1984
Ensayos de fase II/actividad en cáncer de ovario	1985-1986
Semisíntesis de la cadena lateral del taxol	1986
Síntesis de la cadena lateral del taxol	1990-1993
Bristol-Myers Squibb recibe la autorización por parte del NCI para su desarrollo farmacéutico	Enero 1991
Autorización por parte del FDA como nueva droga	Diciembre 1992
Síntesis total del taxol/Holton-Nicolau	1994

debido a su estrecha relación taxonómica. Los resultados cromatográficos obtenidos de las tres fracciones probadas: hojas, tallos y corteza corroboran lo reportado en otras especies de *Taxus* en cuanto a corteza, sin embargo el hecho de que el porcentaje en hojas sea mayor difiere con lo encontrado en la especie *baccata*, ya que se ha reportado producción de taxol en hojas pero en menor porcentaje con respecto al encontrado en corteza. Es importante señalar que la especie mexicana requiere de 18 a 20 años para alcanzar su madurez, mientras que la especie americana, de la cual se obtiene el taxol para la elaboración del producto farmacéutico utilizando actualmente en la práctica médica, requiere de más de 100 años.

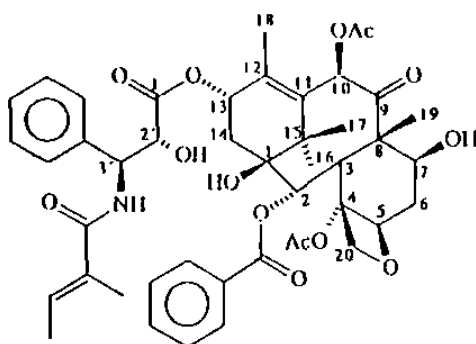
Por el método espectrofotométrico se demostró que el tejo mexicano sí produce compuestos diterpénicos con actividad estabilizadora de microtúbulos. El hecho de que la actividad mostrada por la fracción de corteza sea mayor que la que se presenta en hojas a pesar de que en las determinaciones cromatográficas se encontró un mayor rendimiento en hojas que en corteza; podría deberse a la presencia de algún enantiómero, ya que debido a la gran cantidad de grupos quirales se tiene la posibilidad de tener éste tipo de compuestos, además de que se utilizaron fracciones de los extractos, por lo que existe la posibilidad de una mezcla con alguna de las otras taxanas relacionadas íntimamente con el taxol, considerando que sus estructuras químicas son muy similares, se tiene reporte de que se han aislado más de 100 derivados de taxana de otras especies de tejos (Barboni. 1994), de las cuales solo unas pocas tienen el grupo feniloserina en el carbono 13 el cual es un requerimiento primario para una significativa actividad antitumoral *in vivo* (Guéritte-Voegelein. 1991). Además de que hay

estudios reportados de actividad citotóxica de taxol y sus análogos donde se puede apreciar muy poca diferencia entre sus estructuras con alguno de ellos como se muestra en la Fig 11

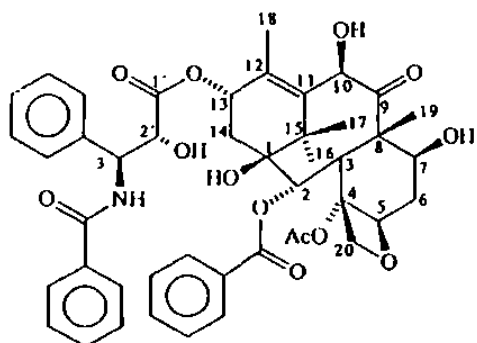
Datta y colaboradores (1994) demostraron que varios compuestos análogos al taxol, a pesar de que presentan resultados óptimos en cuanto a actividad estabilizadora de microtúbulos, poseen diferente citotoxicidad *in vitro* (Tabla 5). Por otra parte se requiere procesar más las fracciones, con el objeto de purificarlas, eliminando de ésta manera las taxanas adjuntas y quizá se podrán explicar las diferencias encontradas con el rendimiento de taxol determinado por técnicas cromatográficas. Esto cobra mayor importancia porque actualmente están por concluirse los estudios clínicos del compuesto taxotere denominado comercialmente como Docetaxel el cual se obtiene sintéticamente a partir del precursor del taxol baccatin III extraído de hojas de la especie europea *Taxus baccata*. Considerando que *T. globosa* también sintetiza en hojas y que esto puede considerarse como un recurso renovable. Plantea la posibilidad de utilizar de forma razonable las hojas de *T. globosa* como una fuente alternativa para la obtención de taxol. Además sería importante analizar la presencia de taxol en raíz considerando los exitosos resultados obtenidos por Enaksha R.M. y col.(1994) en cultivos hidropónicos en *Taxus media* y *Taxus cuspidata*.



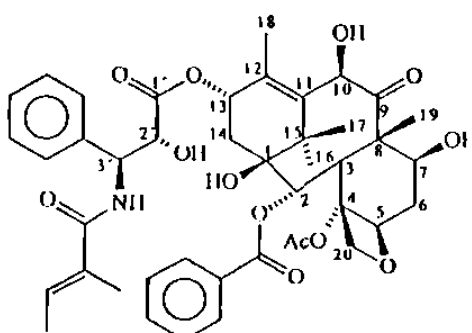
Taxol



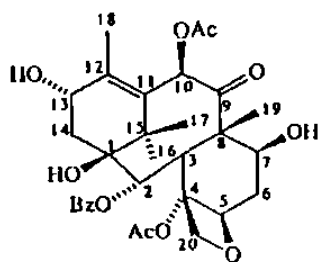
Cephalomannine



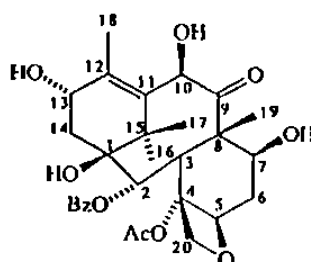
10-Deacetyltaxol



10-Deacetylcephalomannine



Baccatin III



10-Deacetylbaccatin III

Figura No. 11.- Estructuras de taxanas aisladas de especies de *Taxus*.

Tabla 5.- Actividad citotóxica del taxol y sus análogos sobre líneas celulares tumorales en cultivo.

COMPUESTO	IC ₅₀ (mEq/ml)
TAXOL	0.02
CEFALOMANIN	0.04
10-DEACETILTAXOL-7-XILOSIDO	0.6
10-DEACETILCEFALOMANIN-7-XILOSIDO	0.8
TAXOL-7-XILOSIDO	0.07
10-DEACETILTAXOL	0.02
10-DEACETILBACATIN III	> 10

VII. CONCLUSIONES

En base a los resultados mostrados de las pruebas efectuadas a estas fracciones, se puede establecer que la especie mexicana del género *Taxus globosa*, también sintetiza diterpenoides con actividad estabilizadora de microtúbulos de la misma manera que otras especies de éste género. Se comprobó también, que éstos compuestos se sintetizan tanto en corteza como en hojas y tallos verdes. Deberá hacerse un análisis químico más profundo de éstas fracciones, para determinar si además de taxol se producen moléculas estructuralmente cercanas que presenten actividad estabilizadora de microtúbulos. Los resultados obtenidos, apoyan fuertemente la implementación de un método de cultivo en invernaderos y/o de cultivos celulares como fuente renovable de taxol.

VIII. PERSPECTIVAS.

Las muestras estudiadas de corteza, hojas y tallos de *T. globosa* fueron colectadas en el mes de agosto por lo que se requiere un estudio que implique el análisis de producción de taxol en diferentes épocas del año. Por otra parte se requiere ampliar la colecta hacia otras zonas geográficas de la República Mexicana para evaluar éste factor en cuanto al rendimiento, así como diferencias de acuerdo a la edad del árbol.

El estudio con cultivos de tejido e hidróponia podría ser una alternativa aunado a lo anterior para tener una fuente alternativa de taxol que permita conservar a ésta especie fuera del uso indiscriminado y consecuentemente de su extinción.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Barboni L, Gariboldi P, Torregiani E, Appendino G, Gabetta B, Bombardellis Ezio. 1994 Taxol analogues from the roots of *Taxus x media*. *Phytochemistry* 36:987-990
- Beijnen JH. 1992 New Cytotoxic drugs and targets in oncology *Pharm Weekbl (Sci.)* 14(4A):258-67
- Black DJ, Livingston RB 1990. Antineoplastic Drugs in 1990. A review (Part I) *Drugs* 39:489-501
- Black DJ, Livingston RB. 1990. Antineoplastic Drugs in 1990. A review (Part II). *Drugs* 39:652-673
- Boletín de Morbilidad y mortalidad SSA. 1994. Vol. IX No.4:26-30
- Chen WM, Zhang PL, Wu B, Zheng QT. 1991. Studies on the chemical constituents of *Taxus yunnanensis*. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 26:747.
- DeBrabander M, Genens G, Nuydens R, Willebrands R, De Mey J. 1981. Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc Natl Acad Sci* 78:5608-12.
- Donehower RC, Rowinsky EK, Grochow LB, Longnecker SM Ettinger DS. 1987. Phase I trial of taxol in patients with advanced cancer. *Cancer Treat Rep* 71:1171.
- Enasksha R.M., Wickremesinhe, Arteca R.N. 1994. Roots of hydroponically grown *Taxus* plants as a source of taxol and related taxanes. *Plant Science* 101:125.
- Einzing G, Wiemik P, Sasloff J. 1990. Phase II study of taxol in patients with advanced ovarian cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 31:114.
- Farnsworth NR. 1981. An approach utilizing information for tradicional medicine to identify tumor inhibing plants. *J Ethnophar* 3:85-99.
- Fett-Neto AG, DiCosmo F. 1992. Distribution and amounts of taxol in diferent shoot parts of *Taxus cuspidata*. *Plant Med* 58:464
- Guéritte-Voegelein F, Guénard D, Lavelle F, Le Goff MT, Moangata L, Potier P. 1991. Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity *J Med Chem* 34: 992-998.

- Hamel E, Del Campo AA, Lowe MC, Lin CM 1981 Interactions of taxol, microtubule associated proteins, and guanine nucleotides in tubulin polymerization. *J Biol Chem* 256:11887-11894
- Hartree EF, 1972. Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. *Anal Biochem* 48: 422-427.
- Heinstein PF, Chang CJ. 1994. Taxol. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 45:663-74
- Iwao O, Duclos O, Zucco M, Bissery MC, Combeau C, Vrignaud P. 1994. Synthesis and Structure-Activity Relationships of New Antitumor Taxoids. *J Med Chem* 37:2602-2608
- Kingston D.T. 1991. The Chemistry of taxol *Pharmac Ther* 52: 1-34.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage "T4". *Nature* 227:680.
- Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Raber M, Benjamin RS. 1990. A phase II trial of taxol in metastatic melanoma. *Cancer* 65:2478.
- Lipton RB, Apfel SC, Dutscher JP. 1988. Taxol produces a predominantly sensory neuropathy *Neurology* 39:368.
- Manfredi JJ, Horwitz SB. 1984. Taxol: an mitotic agent with a new mechanism of action *Pharmac Ther* 25:83-125.
- Markman M, Rowinsky E, Hakes T, Reichman B, Jones W, Lewis JL, Rubin S, Curtin J, Barakat R, Phillis M, Hurowitz L, Almadrones L, Hoskins W. 1992. Phase I trial of intraperitoneal taxol: A gynecology group study. *J Clin Oncol* 10:1165.
- Martínez-Rodríguez H. 1981. Aislamiento de posibles mutantes "sin sentido" en una línea celular de mamífero. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. México, D.F.
- McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, Donehower RC. 1989. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med* 111:273.
- McGuire WP. 1992. Experimental Chemotherapy. *Ovarian Cancer* 6:927.
- Miller RW, Powell RG, Smith CR, Arnold R, Clardy J. 1981. Antileukemic alkaloids from *Taxus wallicheana*. *Zucc J Org Chem* 46: 1469-1474.

- Nicolau KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, Guy RK, Claiborne CF, Renaud J, Couladouros EA, Paulvannan K. 1994. Total synthesis of taxol. *Nature (Lond.)* 367:630-634
- Parness J, Kingston DG, Powell RG, Harracksingh C, Horwitz SB. 1982. Structure-activity study of cytotoxicity and microtubule assembly in vitro by taxol and related taxanes *Biochem Biophys Res Commun* 105:1082-1089.
- Parness J, Asnes CF, Horwitz SB. 1983. Taxol binds differentially to flagellar outer doublets and their reassembled microtubules. *Cell Motil* 3:123-130.
- Phillipson JD. 1994. Natural products as drugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88, supplement 1, 17-19.
- Rao KP. 1993. Taxol and Related Taxanes. I. Taxanes of *Taxus brevifolia* Bark. *Pharmaceutical Research* 10: 521-524.
- Riondel J, Jacrot M, Picot F, Beriel H, Moureguad C, Poiter P 1986. Therapeutic response to taxol of six human tumor xenografted into muscle mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 17: 137.
- Rowinsky EK, Burke PJ, Karp JE. 1989. Phase I and pharmacodynamic study of taxol in refractory acute leukemias. *Cancer Res* 49:4640-4647.
- Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. 1990. Taxol: A Novel Investigational Antimicrotubule Agent. *J Nat Cancer Inst.* 82:1247-1259.
- Rowinsky EK, Burke PJ, Karp JE, Tucker RW, Ettinger DS, Donehower RC. 1992. Phase I trial of intraperitoneal taxol: A gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 10:1485.
- Said-Fernández S, Vargas VJ, Castro GJ, Mata CBD, Navarro ML, Lozano GG, Martínez RH. 1988. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82:249-253.
- Sarosy G, Kohn E, Stone DA, Rothenberg M, Jacob J, Adamo DO, Ognibene FP, Cunnion RE, Reed E. 1992. Phase I study of taxol and granulocyte colony-stimulating factor in patients with refractory ovarian cancer. *J Clin Oncol* 10:1165.
- Senelh V, Blechert S, Colin M, Guenard D, Picot F, Potier P, Varene P. 1984. Mise en évidence de nouveaux analogues du taxol extraits de *Taxus baccata*. *J Natl Prod* 47:131.
- Shiff PB, Fant J, Horwitz SB. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277: 665- 667.

- Shiff PB, Horwitz SB. 1980. Taxol stabilizes microtubule in mouse fibroblast cells Proc Nat Acad Sci 77:1561-1565
- Shiff PB, Horwitz SB. 1981. Taxol Assembles tubulin in the Absence of Exogenous Guanosine 5'-Triphosphate or Microtubule-Associated Proteins. Biochemistry 20:3247-3252.
- Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR. 1973. Microtubule assembly in absence of added nucleotides. Proc Nat Acad Sci 70: 765-768.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D. 1993. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. Science 260:214-216.
- Swindell CS, Krauss NE. 1991. Biologically active taxol analogues with deleted A-ring side chain substituents and variable C-2' configuration. J Med Chem 34: 1176-1184.
- Wall ME, Wani MC. 1995. Camptothecin and Taxol: Discovery to Clinic- Thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. Cancer Research 55: 753-760.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, Mc Phail AT. 1971. Plant antitumor agents. VI The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, J Am Chem Soc 93:2325-2327.
- Witherup KM, Look SA, Stasko MW, Mc Cloud TG, Issaq HJ, Muschik GM. 1989. High Performance Liquid Chromatographic separation of taxol and related compounds from *Taxus brevifolia*. J Liq Chromatogr 12:2117-32.
- Xu LX, Liu AR. 1989. Determination of taxol in extract of *Taxus chinensis* by reversed phase HPLC. Yaoxue Xuebas 24: 552-555.
- Zamir LO, Nedeia ME, Belair S, Sauriol F, Mamer O, Jacqmain E, Jean FI, Garneau FX. 1992. Taxanes isolated from *Taxus canadensis*. Tetra Lett 33:5173.

