

Avenços en la producció de taxol en cultius in vitro de cèl·lules i teixits de *Taxus spp.*

TREBALL FI DE GRAU

Realitzat per:

Maria Almendro Martí

Tutoritzat per: **Dra. Ana María Pelacho Aja**

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	1
2. OBJECTIUS	3
3. METODOLOGIA EMPRADA EN LA REVISIÓ	3
4. RESULTATS DE LA RECERCA BIBLIOGRÀFICA.....	4
5. CONTINGUT DE LA REVISIÓ.....	6
5.2. Ruta de la biosíntesi del Taxol a <i>Taxus spp.</i>	6
5.2. Semi síntesi del taxol.....	7
5.3. Producció de taxol en cultius in vitro de <i>Taxus spp.</i>	8
5.3.1. Optimitzacions en el cultiu in vitro de <i>Taxus spp.</i>	9
5.3.2. Elicitors utilitzats per la producció de taxol.....	11
5.3.3. Estratègies d'elicitació en cultius cel·lulars i de cal·lus de <i>Taxus spp.</i> amb elicitors biòtics.....	14
5.3.4. Estratègies d'elicitació en cultius cel·lulars i de cal·lus de <i>Taxus spp.</i> amb elicitors abiòtics.....	18
5.3.5. Estratègies d'elicitació en cultius cel·lulars i de cal·lus de <i>Taxus spp.</i> amb l'ús conjunt d'elicitors biòtics i abiòtics.....	19
5.4. Enginyeria metabòlica per la producció de taxol	21
5.4.1. Producció de taxol en cultius cel·lulars de <i>T. x media</i> que contenen el gen <i>TXS</i> de <i>T. baccata</i>	23
5.4.2. Producció de taxol en cultius de <i>hairy roots</i> de <i>T. x media</i> que contenen el gen <i>TXS</i> de <i>T. baccata</i>	25
5.4.3. Producció heteròloga de taxol	26
6. DISCUSSIÓ	26
7. BIBLIOGRAFIA	29

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1.- Avantatges i inconvenients de la producció semi sintètica de taxol.....	7
Taula 2.- Avantatges i desavantatges de la producció de taxol en cultius cel·lulars de <i>Taxus spp</i>	9
Taula 3.- Elicitors abiòtics i biòtics utilitzats per la producció de taxol.....	13
Taula 4.- Concentració de taxol i productivitat dels cultius cel·lulars de <i>T. globosa</i> lliures i immobilitzats el dia 3 de l'addició del jasmonat de metil (MeJA).....	15
Taula 5.- Producció de taxol obtingut de les cèl·lules en suspensió de <i>T. globosa</i> sota el tractament amb L-butionina sulfoximina (BSO) i peròxid d'hidrogen (H ₂ O ₂).....	18
Taula 6.- Acumulació de taxol en resposta a l'ultrasò (US) o el seu efecte combinat amb el jasmonat de metil (MeJA) o àcid salicílic (SA)	19

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.- Estructura química del taxol.....	1
Figura 2.- Nombre de publicacions obtingudes per any en la primera cerca amb les paraules clau “production” i taxol.....	4
Figura 3.- Nombre de publicacions segons l'àrea d'investigació.....	5
Figura 4.- Ruta biosintètica del taxol.....	6
Figura 5.- Producció total de taxans en cèl·lules <i>T. globosa</i> lliures i immobilitzades durant la segona fase del cultiu en el medi T2 amb o sense elicitació amb jasmonat de metil (MeJA)....	15
Figura 6.- Efecte de la coronatina (COR) i les calix[8]arens (CAL), administrades per separat o conjuntament, en la producció de paclitaxel en cultius cel·lulars de <i>T. media</i> cultivats durant 24 dies en un medi de producció.....	17
Figura 7.- Concentració de paclitaxel sota estrès osmòtic en cultiu de cal·lus de <i>T. baccata</i> després de 21 dies de cultiu.....	19
Figura 8.- Contingut de taxans extracel·lulars en cultius cel·lulars de <i>T. globosa</i> cultivats durant 20 dies en condicions de control i amb l'addició de ciclodextrina (CD) i coronatina (COR) o ambdós elicitors junts.....	20
Figura 9.- Producció individual de taxans en cultius cel·lulars de <i>T. media</i> amb l'elicitació de perfluorodecalina desgasada (PFD _{degas}), coronatina (COR) i ciclodextrina (CD).....	21
Figura 10.- Contingut total de taxol en cultius cel·lulars de <i>T. media</i> elicitat amb ciclodextrina (CD) metilada aleatòriament i jasmonat de metil (MeJA) per separat o combinats durant 23 dies.....	24
Figura 11.- Contingut individual de taxans en cultius cel·lulars de <i>T. media</i> cultivats en condicions de control i amb l'addició de ciclodextrina (CD), coronatina (COR) o ambdós elicitors junts.....	25

LLISTA DE SIGLES I ACRÒNIMS

B III	Baccatina III
B5	Medi de cultiu Gamborg
2,4D	Àcid 2,4-diclorofenoxiacètic
10-DAB III	10-desacetilbaccatina III
ABA	Àcid abscísic
BAP	Benzilaminopurina
BSO	L-butionina sulfoximina
CD	Ciclodextrina
COR	Coronatina
DMAPP	Pirofosfat de dimetilal·lil
DO	Oxigen dissolt
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GA ₃	Àcid gibberèl·lic
GGPP	Pirofosfat de geranilgeranil
GGPPS	Geranilgeranil pirofosfat sintasa
H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
IPP	Pirofosfat d'isopentenil
KN	Quinetina
LA	Àcid làuric
PEG	Polietilenglicol
PFD	Perfluorodecalina
PHE	L-fenilalanina
MeJA	Jasmonat de Metil
MEP	Metileritritol fosfat
MS	Medi de cultiu Murashige i Skoog

MVA	Mevalonat
NAA	Àcid naftalenacètic
PIC	Picloram
ROS	Espècies reactives d'oxigen
SH	Medi Schenk i Hildebrandt
SNP	Nitroprussiat de sodi
TXS	Taxadiè sintasa
US	Ultrasonicació
WPM	<i>Woody Plant Medium</i>

RESUM

El taxol, és un metabòlit secundari obtingut en molt baixes concentracions de l'escorça del teix, trobat per primera vegada a l'escorça de *Taxus brevifolia*. A causa de la seva activitat anticancerosa contra diversos tipus de càncer, com el de mama i ovari, s'ha convertit en un dels fàrmacs antineoplàstics més efectius desenvolupats fins el moment. Malgrat els molts èxits clínics, l'obtenció limitada de taxol de l'escorça del teix no permet satisfer les demandes creixents de taxol al mercat. Per aquesta raó, aquest treball bibliogràfic pretén centrar-se en les diferents estratègies desenvolupades i d'altres que estan en recerca actualment per incrementar la producció de taxol mitjançant el cultiu in vitro de cèl·lules i teixits de *Taxus spp.* En aquesta revisió, es presentarà primerament la semi síntesi com a mètode per a la producció de taxol, a continuació, la producció de taxol en cultius in vitro de *Taxus spp.*: s'exposaran algunes de les optimitzacions que són efectives per augmentar la producció de taxol i, sobretot, s'emfatitzarà en els diferents elicitors utilitzats, especialment en els més recentment estudiats.

A continuació, s'exposaran les diferents estratègies desenvolupades a nivell de laboratori amb els elicitors i les seves combinacions en cultius cel·lulars i de cal·lus de *Taxus spp.* Posteriorment, també es farà referència a l'enginyeria metabòlica aplicada fins al moment i es donarà a conèixer les diferents estratègies desenvolupades mitjançant elicitors en cultius cel·lulars i de *hairy roots* de *Taxus media* que incorporen el transgèn de la taxadiè sintasa de *Taxus baccata* per la producció de taxol. Finalment, s'identificaran alguns dels avenços en la producció de taxol en organismes heteròlegs. La informació recopilada demostra que se segueix investigant en nous mètodes més eficaços i sostenibles per una major producció de taxol, i s'identifica l'enginyeria metabòlica com la millor estratègia per incrementar la producció de taxol en un futur.

RESUMEN

El taxol, es un metabolito secundario obtenido en muy bajas concentraciones de la corteza del tejo, encontrado por primera vez en la corteza de *Taxus brevifolia*. Debido a su actividad anticancerosa contra varios tipos de cáncer, como el de mama y ovario, se ha convertido en uno de los fármacos antineoplásicos más efectivos desarrollados hasta el momento. A pesar de los muchos éxitos clínicos, la obtención limitada de taxol de la corteza del tejo no permite satisfacer las crecientes demandas de taxol en el mercado. Por esta razón, este trabajo bibliográfico pretende centrarse en las distintas estrategias desarrolladas y otras que están en investigación hasta el momento para incrementar la producción de taxol mediante el cultivo in vitro de células y tejidos de *Taxus spp.* En esta revisión, se presentará primeramente la semi síntesis como método para la producción de taxol, y a continuación la producción de taxol en cultivos in vitro de *Taxus spp.*: se expondrán algunas de las optimizaciones que son efectivas para aumentar la producción de taxol y, sobre todo, se enfatizará en los distintos elicitores utilizados, especialmente en los estudiados más recientemente.

A continuación, se expondrán las distintas estrategias desarrolladas a nivel de laboratorio con los elicitores y sus combinaciones en cultivos celulares y de callos de *Taxus spp.* Posteriormente, también se hará referencia a la ingeniería metabólica aplicada hasta el momento y se dará a conocer las distintas estrategias desarrolladas mediante elicitores en cultivos celulares y de *hairy roots* de *Taxus media* que incorporan el transgén de la taxadieno sintasa de *Taxus baccata* para la producción de taxol. Finalmente, se identificarán algunos de los avances en la producción de taxol en organismos heterólogos. La información recopilada evidencia que se sigue investigando en nuevos métodos para una mayor producción de taxol, más eficaces y sostenibles, y se identifica la ingeniería metabólica como la mejor estrategia para incrementar la producción de taxol en un futuro.

ABSTRACT

Taxol is a secondary metabolite obtained in very low concentrations from the yew bark, found for the first time in the bark of *Taxus brevifolia*. Due to its anticancer activity against various types of cancer, such as breast and ovarian, it has become one of the most effective antineoplastic drugs developed to date. Despite many clinical successes, the limited availability of taxol from the bark of yew is unable to meet the growing demands for taxol in the market. For this reason, this review intends to focus on the different strategies developed and others that are currently under investigation to increase taxol production through in vitro culture of cells and tissues of *Taxus spp.* In this review, firstly, semi synthesis will be presented as a method for taxol production, followed by taxol production in vitro cultures of *Taxus spp.*: some of the optimizations that are effective in increasing taxol production will be discussed and, especially, the different elicitors used will be emphasized, mostly those studied more recently.

Subsequently, the different strategies developed at the laboratory level with the elicitors and their combinations in cell and callus cultures of *Taxus spp.* will be exposed. Thereafter, metabolic engineering applied to date for the production of taxol will be referenced and also, the different strategies developed with elicitors in cell and *hairy roots* cultures of *Taxus media* carrying the taxadiene synthase transgene of *Taxus baccata*. Finally, some of the advances in the production of taxol in heterologous organisms will be identified. The information collected shows that researchers are still investigating new, more efficient and sustainable methods for greater taxol production, and metabolic engineering is identified as the best strategy to increase taxol production in the future.

1. INTRODUCCIÓ

El taxol[®] (Figura 1), metabòlit secundari d'estructura complexa conegut també pel seu nom genèric de paclitaxel, és un alcaloide diterpè de la família dels isoprenoides i és un dels fàrmacs anticancerosos més efectius desenvolupat fins el moment (Cusido et al., 2014). Els metabòlits secundaris, estan generalment, modulats pels estressos biòtics i abiòtics, entre d'altres els atacs de plagues, l'exposició a la sequera, temperatures extremes, excés d'irradiació, salinitat o desequilibri mineral (Matsuura et al., 2018). Per tant, la seva síntesi es pot potenciar aportant el·licitors, compostos que medien les respostes adaptatives a aquests estressos. Aquest metabòlit secundari, va ser descobert a finals dels anys 60 a l'escorça del teix del Pacífic (*Taxus brevifolia*). Després d'haver passat per una llarga fase de desenvolupament per la seva aprovació inicial com a fàrmac de quimioteràpia per part de la FDA (*Food and Drug Administration*) l'any 1992, es va acabar convertint en el producte natural vegetal amb més èxit en quimioteràpia (Mutanda et al., 2021).

El taxol, exerceix l'activitat anticancerosa a través de diversos mecanismes, el principal, es caracteritza per l'estabilització de l'ensamblatge dels microtúbuls i evita que aquests es despolimeritzin. Com a resultat es produeix el bloqueig de la progressió de la mitosis i les cèl·lules es detenen a la fase G2/M del cicle cel·lular i finalment sofreixen apoptosi, el que inhibeix la replicació cel·lular (Changxing et al., 2020). Inicialment, el taxol va ser aprovat pel tractament del càncer d'ovari i carcinomes de mama refractaris. Posteriorment, es van anar ampliant els seus usos clínics pel tractament de carcinoma de pulmó de cèl·lules no petites, el sarcoma de Kaposi i els càncers de pulmó, de mama, de bufeta, pròstata, esòfag i de pàncrees (Mutanda et al., 2021). D'altra banda, el taxol també s'ha estudiat pel tractament d'altres malalties caracteritzades per l'angiogènesi com la psoriasis i a més, també s'ha estudiat pels seus efectes terapèutics en trastorns neurològics que impliquen la patologia de la proteïna tau com l'Alzheimer o el Parkinson (Escrich et al., 2021).

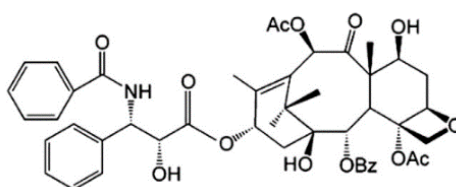


Figura 1.- Estructura química del taxol.
Font: (Cusido et al., 2014).

La font natural d'aquest fàrmac és principalment l'escorça dels arbres d'algunes espècies *Taxus* en que s'hi troba en molt baixes concentracions entre 0,01% i 0,05% del seu pes sec (Yang et al., 2020). La quantitat estimada que es necessita de fàrmac purificat és aproximadament de 250 kg anuals (Barrales-Cureño et al., 2022). Així, degut a que la

producció original de taxol, involucra l'aïllament directe d'aquest de l'escorça dels teixos, es necessiten tres arbres de 100 anys que contenen aproximadament 12 kg d'escorça per produir 1 g de taxol pur o bé es requereixen 3000 teixos per produir 1 kg de taxol, que és la quantitat estimada necessària per tractar 500 pacients amb càncer (Liu et al., 2016; Barrales-Cureño et al., 2022). A més, a tot això, se li suma que el taxol és sintetitzat juntament amb altres taxans fent que la purificació d'aquest compost altament hidrofòbic sigui molt laboriosa i ambientalment perillosa degut a l'ús de solvents orgànics necessaris per fer-ho (Mutanda et al., 2021). Per aquests motius i degut a la creixent demanda de taxol que supera amb escreix l'oferta de la seva obtenció natural, s'han buscat noves alternatives per obtenir-lo en elevades quantitats i de forma més sostenible (Cusido et al., 2014; Escrich et al., 2021).

Actualment, hi ha quatre mètodes per obtenir el taxol sense afectar els boscos. En primer lloc a través de la seva síntesi química total, costosa econòmicament i amb baix rendiment, que fins el moment no és viable ja que el producte final inclou no només taxol sinó també altres compostos tòxics i a més, la ruta inclou més de 40 passos, amb reaccions complexes i, per tant, no és una forma pràctica, sostenible ni econòmica d'obtenir el taxol. També es pot produir taxol per semi síntesi a través dels taxans més abundants, com la baccatina III (B III), però els costos són elevats i els processos d'extracció d'aquests precursors són difícils (Cusido et al., 2014). Recentment, una altra possibilitat en estudi però que encara produeix concentracions baixes de taxol, és a través de fermentacions de fongs endòfits que creixen i es desenvolupen en el teix, com per exemple *Aspergillus flavipes* (Gallego-Jara et al., 2020). No obstant, és el cultiu de cèl·lules i teixits vegetals el que ha ofert millors perspectives per la seva obtenció fins al moment, utilitzant processos de cultiu in vitro i tècniques d'enginyeria genètica. Aquest sistema és molt avantatjós ja que permet l'obtenció d'un producte d'elevada puresa, lliure de contaminacions, de forma controlada, continua i uniforme; i constitueix un sistema de producció sostenible i renovable (Liu et al., 2016). Tanmateix la seva aplicació ha tingut un èxit limitat fins ara, principalment a causa del coneixement incomplet del metabolisme secundari i del seu control in vitro (Escrich et al., 2021).

En resum, s'han desenvolupat diferents alternatives per obtenir taxol via cultius cel·lulars i de teixits de *Taxus spp.* o més recentment també de *Corylus avellana*, utilitzant elicitors, precursors i millorant les condicions de cultiu. Actualment també s'estan estudiant alternatives d'enginyeria metabòlica modificant la ruta biosintètica del taxol i la producció heteròloga en altres plantes o microorganismes. De totes aquestes alternatives la funcional avui en dia i la que està més desenvolupada és el cultiu cel·lular de *Taxus spp.* aplicant elicitors. No obstant, resulta necessari investigar en la millora de totes les alternatives per incrementar la producció, de forma sostenible i econòmicament viable de taxol.

Aquest treball bibliogràfic recull les diferents possibilitats de produir taxol i en què s'està activament investigant per produir-lo, i que per tant, que faciliti el seu ús en els tractaments dels diferents tipus de càncers, així com, avançar en la seva investigació. Així doncs, s'inclou, les diferents estratègies utilitzades amb el·licitors en la producció de taxol a través del cultiu de cèl·lules i teixits de *Taxus spp.*, els últims avenços en el que sembla ser una solució molt potent que és l'enginyeria metabòlica, a més d'analitzar també estratègies d'elicitació amb cultius cel·lulars i de *hairy roots* que porten el transgen de la taxadiè sintasa (*TXS*) i finalment, donar una visió d'altres avenços aconseguits com és la producció heteròloga d'aquest.

2. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest treball és dur a terme una revisió bibliogràfica per conèixer l'estat actual de la producció del taxol a través del cultiu in vitro de *Taxus spp.*

Per dur-ho a terme, es plantegen els següents propòsits:

- I. Identificar els diferents tipus de cultius vegetals i les diferents espècies de *Taxus* utilitzades.
- II. Determinar els el·licitors que són emprats per augmentar la síntesi de taxol i aquells més recentment descoberts.
- III. Analitzar les diferents estratègies utilitzades amb els diferents tipus d'el·licitors.
- IV. Conèixer l'enginyeria metabòlica aplicada per produir taxol i els últims avenços realitzats.
- V. Analitzar diferents estratègies d'el·licitors en cultius cel·lulars i de *hairy roots* que contenen el transgen de la taxadiè sintasa de *Taxus baccata*.
- VI. Identificar les novetats obtingudes en la producció heteròloga de taxol.

3. METODOLOGIA EMPRADA EN LA REVISIÓ

En aquest apartat, es desenvoluparà el procediment emprat per realitzar la cerca bibliogràfica per poder executar el treball de revisió. S'han utilitzat diferents bases de dades, revistes científiques i pàgines científiques per l'obtenció de dades específiques. Per gestionar tota la informació trobada s'ha utilitzat Mendeley. La cerca d'informació ha estat en anglès, degut a que gran part del contingut científic està en aquesta llengua.

En primer lloc, es van buscar llibres referents al tema a la plataforma *Google Scholar* per adquirir els conceptes més bàsics (taxol, paclitaxel, plantes productores d'aquest, cultius de

teixits vegetals, etc.). En segon lloc, per profunditzar més es van buscar articles, revisions i capítols de llibres a les bases de dades de *Scopus*, *Web of Science* i *PubMed* utilitzant paraules claus (“taxol production”, “taxol production cell culture”, taxol production plants”, taxol cell culture”, entre d’altres) i “boolean operators” (AND, OR i/o NOT) per tal d’acotar la cerca en elements més concrets. Es van obtenir una gran quantitat d’articles i revisions, per aquest motiu també es va aplicar el filtre de l’any de publicació des del 2014 al 2022 perquè, al 2014 hi ha publicat un article de revisió que aporta una molt bona visió sintètica del estat de la producció del taxol, i per acotar també la gran quantitat d’articles i revisions. Tanmateix, s’apliquen altres filtres com ordenar per rellevància els articles, revisions i llibres de les bases de dades i també segons quines àrees de recerca pertanyin.

4. RESULTATS DE LA RECERCA BIBLIOGRÀFICA

Aquest apartat, mostra acompanyat de material gràfic els resultats obtinguts en la recerca bibliogràfica i la importància que té el tema seleccionat. De la primera consulta realitzada a *Web of Science* s’han obtingut 1.544 resultats, que és la base de dades que més s’ha utilitzat per ser la més àmplia en quant a nombre de documents publicats. Després de consultar tots els documents d’interès, se n’han seleccionat 33 per l’elaboració de la revisió, tal i com es pot observar a la bibliografia. En general, no s’han considerat articles que no pertanyessin al *Journal Citation Reports*, que té en compte el *Impact Factor* que permet determinar la importància de les principals revistes d’investigació del món dins de les seves categories temàtiques. Altres documents trobats només s’han considerat per contrastar les idees principals o per corroborar la informació recopilada en els documents utilitzats.

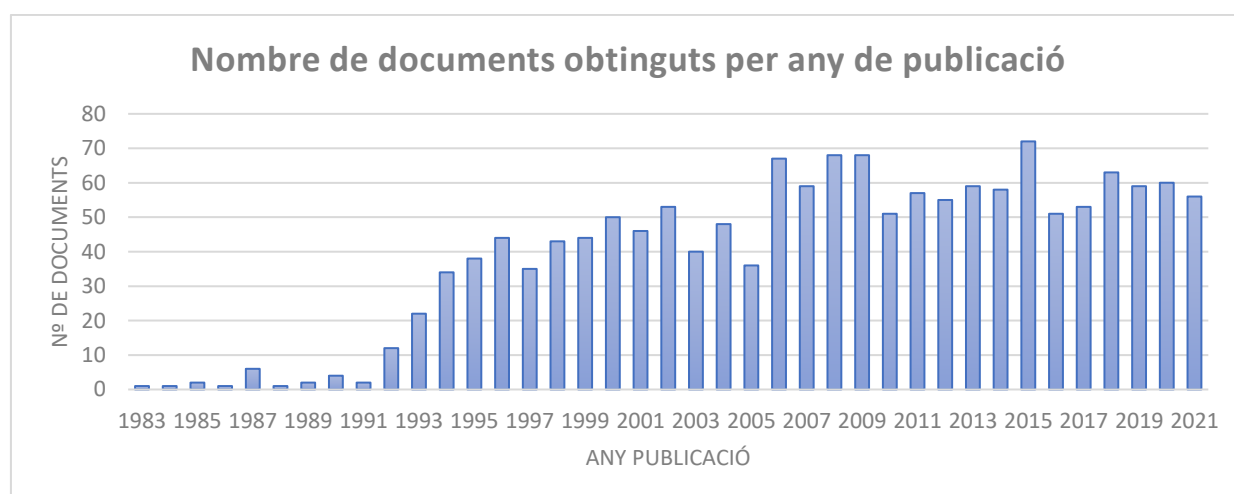


Figura 2-. Nombre de publicacions obtingudes per any en la primera cerca amb les paraules clau “production” i taxol. Font: elaboració pròpia.

A la Figura 2 s’observen els documents publicats des de l’any 1983 fins al 2021 a la base de dades de *Web of Science*, utilitzant com a paraules clau “taxol” AND “production”. S’observa

que hi ha un creixement exponencial en el nombre de publicació de documents entre els anys 1992 i 1995 i a partir d'aquest any fins a l'actualitat s'estabilitza el nombre de publicacions, mostrant que és un tema que segueix essent d'interès. En les demés bases de dades utilitzades s'observa una dinàmica similar.

La cerca de publicacions en bases de dades comença amb una visió general, fins el punt de considerar només aquells articles i revisions a partir de l'any 2014 fins al 2022, després d'haver-los revisat tots i en funció dels objectius del treball, es té en compte la revisió publicada l'any 2014 *A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of Taxus spp.* Limitant la recerca des del 2014, s'identifiquen 472 resultats, a partir d'aquests, per centrar-se en el tema objecte d'estudi s'ha refinat més la cerca utilitzant paraules clau com: "plant cell culture", "metabolic engineering", entre d'altres.

Pel que fa al tipus de documents publicats a partir del 2014, un 69,28% són articles i un 18% són revisions. El 12,72% restant comprèn capítols de llibres, articles de conferència, editorials, etc. Els documents publicats utilitzant les mateixes paraules clau des de l'any 2014 fins al 2022 són majoritaris a l'àrea d'investigació de *Biochemistry Molecular Biology*, seguit de *Pharmacology-Pharmacy*, *Plant Sciences* i *Biotechnology Applied Microbiology* (Figura 3).

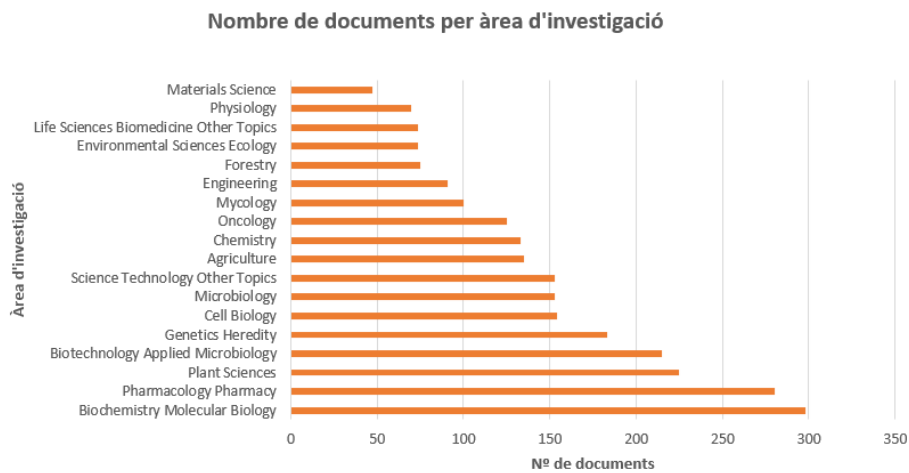


Figura 3.- Nombre de publicacions segons l'àrea d'investigació. Font: Elaboració pròpia.

5. CONTINGUT DE LA REVISIÓ

5.2. Ruta de la biosíntesi del Taxol a *Taxus spp.*

La ruta biosintètica del taxol (Figura 4) es produeix a través de 20 reaccions enzimàtiques, des del precursor diterpenoide, el pirofosfat de geranilgeranil (GGPP) fins l'obtenció de taxol. Es tracta d'un procés complex que es pot dividir en tres parts: la formació del nucli de taxà, la modificació del nucli de taxà i la síntesis de la cadena lateral β -fenilalanil-CoA i l'ensamblatge del taxol (T. Wang et al., 2021).

Primerament, el pirofosfat d'isopentenil (IPP) que es pot convertir amb el pirofosfat de dimetilal·lil (DMAPP) per mitjà d'una isomerasa, és un intermediari comú de la ruta del mevalonat (MVA) produïda al citosol i de la ruta del metileritritol fosfat (MEP) al plastidi. Recentment, a partir de determinats estudis, s'ha suggerit que és la via del MEP la que subministra la major part dels precursors isoprenoides per formar l'esquelet dels taxans (T. Wang et al., 2021). Així, a través de la condensació de tres unitats d'IPP amb el DMAPP catalitzat per la geranilgeranil pirofosfat sintasa (GGPPS), es forma el precursor diterpenoide, el pirofosfat de geranilgeranil (GGPP). Aleshores, a través del enzim taxadiè sintasa (TXS) cicla el GGPP i es forma el primer intermediari que conté l'anell taxà, que és el taxadiè (Changxing et al., 2020; T. Wang et al., 2021).

Després, es produeix la modificació de l'anell de taxà a través d'altres etapes metabòliques incloent l'acció de diverses hidroxilases, acil/aroil transferases, una epoxidació i oxidació formant-se la 10-desacetilbaccatina III (10-DAB III) que és considerada un dels precursors més importats per la semi síntesi del taxol i la baccatina III (B III) (Cusido et al., 2014; Escrich et al., 2021).

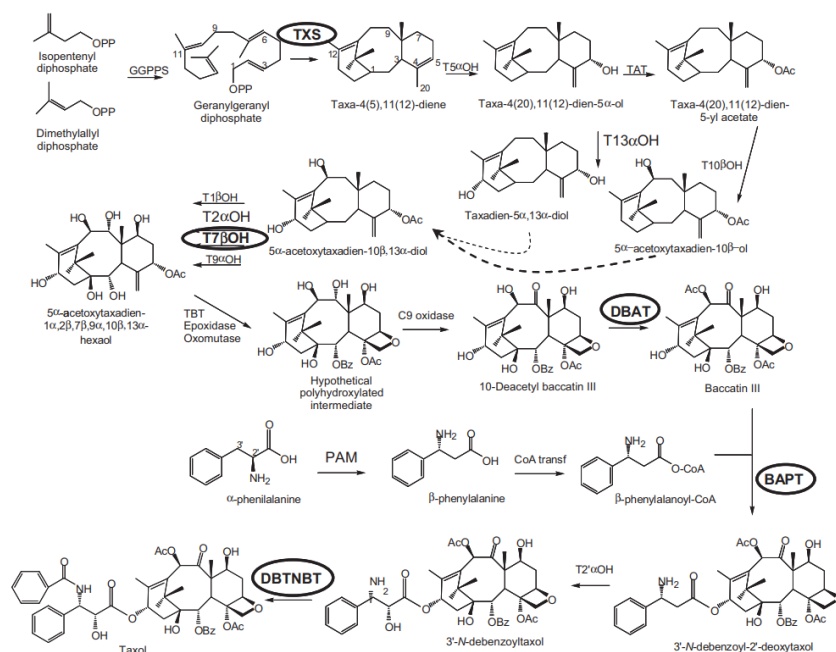


Figura 4.- Ruta biosintètica del taxol. TXS: taxadiè sintasa; T7 β OH: taxà 7 β -hidroxilasa; DBAT: 10-desacetilbaccatina III-10-O-acetiltransferasa; BAPT: C-13-fenilpropanoil-CoA transferasa; DBTNBT: debenzoil taxol N-benzoil transferasa. Font: (Sabater-Jara et al., 2014).

Finalment, se sintetitza la cadena lateral β -fenilalanil-CoA que deriva de la α -fenilalanina. S'uneix la β -fenilalanil-CoA al grup hidroxil del C13 de la B III, formant-se la β -fenilalanil baccatina III que per mitjà de dues etapes més de la ruta biosintètica, s'obté el taxol (Wang et al., 2021). Tot i que la major part de la ruta biosintètica dels taxans s'ha dilucidat i s'han clonat els gens que codifiquen pels respectius enzims involucrats, encara hi ha varis passos que no s'han identificat (Escrich et al., 2021).

5.2. Semi síntesi del taxol

En quant a la semi síntesi del taxol, els intermediaris de la biosíntesi de taxol, el 10-DAB III i la B III, es poden aïllar relativament en elevades quantitats de les acícules de *Taxus spp.* per obtenir el taxol semi sintèticament (Yang et al., 2020). Donat que la concentració de 10-DAB III és molt més elevada que el taxol i que es pot obtenir de teixos cultivats en un viver, la seva conversió a taxol és una bona opció per obtenir-lo industrialment. Per tant, s'ha plantejat la semi síntesi del taxol a partir de 10-DAB III per ser un dels principals mètodes pel subministrament comercial d'aquest (Liu et al., 2016). El primer informe conforme es va produir la semi síntesi química del taxol es remunta a l'any 1988, quan aquest va ser sintetitzat a partir del 10-DAB III, aïllat de les acícules de *T. baccata* (Sabzehzari et al., 2020). Posteriorment, la B III també va ser utilitzada com a matèria primera per la semi síntesi del taxol. Degut a l'elevada puresa i estabilitat del taxol obtingut semi sintèticament, permet que a l'any 1994 sigui aprovat per la FDA pel seu ús clínic (Yang et al., 2020).

Actualment, la semi síntesi del taxol és un dels principals subministraments comercials d'aquest, que implica l'extracció dels intermediaris del paclitaxel, el 10-DAB III o el B III de les acícules o de cultius cel·lulars de *Taxus spp.* No obstant, aquest procés presenta una sèrie de desavantatges (Taula 1) (Howat et al., 2014). Per tant, per una banda, la semi síntesi, és una manera prospectiva de resoldre l'escassetat del paclitaxel, d'altra banda, a causa de la complexa estructura química d'aquest, la síntesis semi sintètica requereix garantir la quimioselectivitat, fet que el converteix en un procediment tediós i laboriós i per tant, limita la seva aplicació pràctica (Yang et al., 2020). Degut a tots aquests factors, s'intenta buscar altres alternatives per la producció del taxol, i també s'ha tornat a revisar la possibilitat de produir-lo a partir de la seva font natural.

Taula 1.- Avantatges i inconvenients de la producció semi sintètica de taxol. Elaboració pròpia a partir de: (Howat et al., 2014; Jair Barrales-Cureño et al., 2016.; Yang et al., 2020).

Avantatges	Inconvenients
Matèries primes riques	El procés de síntesis complicat
Recurs renovable abundant	Estructura molt complexa del taxol
Millora del rendiment en comparació amb l'extracció directa del taxol de l'escorça	Baixos rendiments de producció en general

Apte per la producció industrialitzada	Producció industrialitzada encara no és del tot pràctica i amb elevat cost de producció
Reconstrucció estructural flexible	L'extracció dels precursors si es realitza a partir del teix, la quantitat d'aquests depèn de factors ambientals i epigenètics
Elevada puresa i qualitat	Purificació dificultosa dels precursors
Procediment eficient	Creixement lent dels teixos

5.3. Producció de taxol en cultius in vitro de *Taxus spp.*

Els cultius de teixits vegetals de *Taxus spp.* s'ha considerat un mètode atractiu per la producció de taxol en els darrers anys (Liu et al., 2016), sobretot, s'ha emprat els cultius in vitro de cal·lus, de cèl·lules vegetals o d'òrgans com la tija, estròbils i arrels, ja sigui per sistemes d'immersió temporal o mitjançant l'ús de bioreactors (Barrales-Cureño et al., 2016). De fet, actualment, el cultiu cel·lular a escala industrial és una de les principals fonts comercials del taxol, que es produeix d'elevada qualitat (Matsuura et al., 2018).

Durant l'any 1989 es va trobar que el cultiu cel·lular de *T. brevifolia* podia produir taxans i els seus derivats, inclús que la producció del taxol podia arribar a 1-3 mg/L després de dues a quatre setmanes del seu cultiu (Yang et al., 2020). Fins que a l'any 1992 es va realitzar amb èxit un cultiu in vitro productor de taxol amb *T. cuspidata* (Sabzehzari et al., 2020). Des d'aleshores, s'observa que les diverses espècies de *Taxus spp.* creixen correctament en condicions in vitro i produeixen taxol com és el cas, entre d'altres, de *T. baccata*, *T. cuspidata*, *T. media* (híbrid entre *T. baccata* i *T. cuspidata*), *T. chinensis* i més recentment *T. globosa*. Com a resultat, el cultiu cel·lular proporciona l'oportunitat de produir taxol en condicions in vitro, sense les limitacions associades a la baixa concentració d'aquest en l'escorça del teix (Liu et al., 2016; Yang et al., 2020). A més, des de fa temps, grups de recerca d'arreu del món s'han centrat en la producció de taxol a partir de cultius cel·lulars de *Taxus spp.* des de petita escala fins a nivell de bioreactor. Aquests, s'obtenen a partir de cal·lus friables i de creixement ràpid, cultivats en un medi líquid, mantingut en condicions adequades d'aeració, sacsejat, il·luminació, temperatura i altres paràmetres perquè es desintegri i obtenir les cèl·lules en suspensió (Cusido et al., 2014; Barrales-Cureño et al., 2022).

S'han aconseguit nombroses progressions en la producció del metabòlit secundari amb l'optimització de les condicions del cultiu, millorant el procediment del cultiu i la composició del medi (Sabzehzari et al., 2020). Primerament, pel que respecta a la producció de taxol, es passa d'obtenir 1-3 mg/L de taxol fins arribar a produccions que oscil·len entre 77,5 i 153 mg/L, optimitzant el medi cultiu (Sabzehzari et al., 2020), com va ser el cas de *T. chinensis*, que es va observar que aquest podia créixer ràpidament i produir elevats nivells de taxol en un període curt de temps, establint-se com una bona base per la producció industrialitzada de taxol a través del cultiu cel·lular (Yang et al., 2020). De fet, amb l'elicitació reiterativa d'un cultiu

cel·lular en suspensió de *T. chinensis* s'ha aconseguit un rendiment total de taxans de 610 mg/L, verificant que es pot obtenir una productivitat més elevada mitjançant l'optimització del procés d'elicitació (Sabzehzari et al., 2020). Per tant, la capacitat de les línies cel·lulars per produir taxol, depèn més de les condicions del medi, del sistema de cultiu i dels elicitors utilitzats i no tant en l'espècie de *Taxus* utilitzada (Cusido et al., 2014).

Aquest mètode per produir taxol i els seus derivats presenta una sèrie d'avantatges i desavantatges (Taula 2), ja que per una banda presenta beneficis a diferència de la seva obtenció de forma natural del teix, tot i que d'altra banda hi ha limitacions que s'han de resoldre en el futur per així millorar l'èxit de la producció de taxol a través dels cultius de *Taxus spp.* Per tant, encara que diverses empreses farmacèutiques tenen plataformes de cultiu de cèl·lules vegetals establertes per la producció de taxol o taxans encara hi ha un gran marge de millora per satisfer la creixent demanda del mercat, degut sobretot al desconeixement del metabolisme secundari i del seu control in vitro. Per aquest motiu, hi ha la necessitat urgent de desenvolupar noves estratègies per millorar el coneixement de les vies metabòliques que condueixen a la formació del taxol i d'altres taxans (Cusido et al., 2014). Fins el moment, s'han aconseguit nombroses progressions en l'augment del rendiment de la producció del taxol a través de l'optimització de les condicions del cultiu cel·lular. No obstant això, la baixa productivitat, s'ha convertit en un obstacle, limitant l'aplicació dels cultius cel·lulars a gran escala (Zhao et al., 2016).

Taula 2.- Avantatges i desavantatges de la producció de taxol en cultius cel·lulars de Taxus spp. Elaboració pròpia a partir de: (Cusido et al., 2014; Liu et al., 2016; Sabzehzari et al., 2020; Mutanda et al., 2021).

Avantatges	Desavantatges
No es veuen afectats ni a les condicions ambientals ni estacionals	Desenvolupament cel·lular lent
No estan sotmesos a contaminació	Alta sensibilitat al cisallament
Proveeixen taxol de qualitat de forma continua	Empirisme sobre el metabolisme secundari
Recurs renovable i respectuós amb el medi ambient	Dificultat al utilitzar factors d'estrès i elicitors
Es cultiva independentment de la seva localització original	Agregació cel·lular
No cal l'ús de pesticides ni herbicides	Alts costos de producció
Cicles de creixement es mesuren en setmanes i no en anys	Rendiments baixos i inestables
Menys passos de purificació que si s'extreu del propi teix	Condicions per cada <i>Taxus spp.</i> són diferents

5.3.1. Optimitzacions en el cultiu in vitro de *Taxus spp.*

Tradicionalment, per iniciar i mantenir els cultius in vitro de *Taxus spp.*, s'han utilitzat diferents medis basals com el medi de cultiu Gamborg (B5), Murashige i Skoog (MS), Schenk i Hildebrandt (SH) i el *Woody Plant Medium* (WPM). Encara que, no hi ha cap estudi que

relacioni el medi basal amb la síntesi i secreció de taxol de les cèl·lules al medi, sembla que la concentració i composició de nutrients del medi no només afecta a la viabilitat i creixement cel·lular sinó també a la síntesi de metabòlit (Barrales-Cureño et al., 2022). A més, per incrementar la producció de taxol, s'ha estudiat l'ús de línies cel·lulars d'alt rendiment, l'optimització de fonts de carbohidrats, estratègies de pre-alimentació, la utilització de fitohormones, de precursors, d'elicitors i pel que fa al sistema de cultiu, el sistema de dues fases i la immobilització cel·lular (Sabzehzari et al., 2020).

Tanmateix, per optimitzar la producció de taxol, és crucial que hi hagi una elevada taxa de secreció d'aquest per part de les cèl·lules productores al medi de cultiu, ja que és tòxic per aquestes (Escrich et al., 2021). A més, la secreció al medi, permet que s'estableixin sistemes continus a nivell de bioreactor, evitant així, la destrucció de la biomassa cel·lular per recuperar el taxol i facilitant l'extracció i purificació d'aquest a través de sistemes més sostenibles i econòmicament viables. Per tant, investigar una manera d'augmentar la secreció del taxol sense efectes inhibitoris sobre el creixement i productivitat de les cèl·lules és essencial. La capacitat de secreció, depèn de les condicions del medi de cultiu com la presència d'elicitors i en gran mesura de la línia cel·lular i espècie vegetal utilitzada (Vidal-Limon et al., 2018; Escrich et al., 2021), ja que estudis realitzats amb diferents línies cel·lulars de *Taxus spp.* s'observa una variació entre el 10 i el 90% de la capacitat de les cèl·lules de secretar el taxol al medi (Ramirez-Estrada et al., 2015).

En primer lloc, s'han de seleccionar aquelles línies cel·lulars provinents d'una planta parentiu d'elit per induir calls i obtenir línies altament productives. Els cultius cel·lulars són poblacions heterogènies de cèl·lules amb diferents fisiologies, per tant, s'han de cercar aquelles que produeixin majors concentracions de taxol. A més, un altre factor a considerar, és la mida del agregat cel·lular, degut a la relació inversa entre la mida del agregat cel·lular i el rendiment en la producció de taxol (Matsuura et al., 2018).

En segon lloc, l'optimització de la producció del taxol resulta ser un procés difícil i laboriós, sobretot perquè les millors condicions del creixement són diferents a les de producció. Per tant, com que la producció està dissociada del creixement cel·lular, és recomanable treballar amb un sistema de dues fases, en que primer les cèl·lules es cultiven en un medi optimitzat pel creixement, on s'obté una gran quantitat de biomassa i després es transfereixen a una segona fase, caracteritzada per tenir el medi optimitzat per la producció (Cusido et al., 2014; Matsuura et al., 2018). En aquesta segona fase, es pot incrementar la producció de taxol afegint elicitors, precursors o bé alterant certs factors com l'oxigen (Zhao et al., 2016). Diferents estudis, indiquen que l'extracció *in situ* del taxol de cultius cel·lulars en suspensió o de cal·lus de *Taxus spp.* en sistemes de dues fases, condueix a una millora de la productivitat de taxol. Degut a

que es disminueix l'acumulació de taxans intracel·lulars evitant la seva degradació enzimàtica, a més, disminueix la retroinhibició inhibidora de la biosíntesi de paclitaxel i la seva eliminació del medi, disminueix també l'efecte inhibidor que exerceix sobre el creixement de la biomassa. Per això, es desenvolupen sistemes de dues fases que continguin solvents orgànics immiscibles amb aigua per l'extracció *in situ*, facilitant també, la recuperació del producte. A part, a través de nombrosos estudis, s'ha observat que la immobilització de les cèl·lules en suspensió amb perles d'alginat i cultivades en un bioreactor agitat, incrementa la producció de taxol (Sykłowska-Baranek et al., 2019).

Pel que fa a l'oxigen, és un paràmetre important per la biomassa cel·lular i la producció de taxol. La concentració màxima d'oxigen dissolt (DO) ha de ser diferent del creixement cel·lular i de la formació del producte, per tant, en determinats estudis s'ha demostrat que un elevat DO (60%) és necessari per incrementar la biomassa mentre que un DO baix (20%) és beneficiós per la producció de taxol (Zhao et al., 2016).

En tercer lloc, a través de l'optimització del medi de cultiu, es pot incrementar la producció de taxol, ja sigui optimitzant les fonts de carbohidrats com la de sucrosa, fructosa, etc., que s'ha observat un increment de taxol amb l'addició d'aquestes durant la fase de creixement (Barrales-Cureño et al., 2022). També es pot millorar la producció de taxol utilitzant fithormones com el picloram (PIC), quinetina (KN), àcid gibberèl·lic (GA₃), àcid 2,4-diclorofenoxiacètic (2,4D), benzilaminopurina (BAP), àcid naftalenacètic (NAA) que actuen com a reguladors del creixement i a més, depenent de quins s'utilitzin es poden obtenir diferents perfils de taxans. Tanmateix, es poden utilitzar precursors com la L-fenilalanina (PHE) o el àcid benzoic, elicitors i implementar estratègies combinades entre aquests (Liu et al., 2016; Matsuura et al., 2018).

5.3.2. Elicitors utilitzats per la producció de taxol

L'ús d'elicitors, és una de les estratègies més efectives per incrementar la producció biotecnològica de metabòlits secundaris, ja que inclou compostos que estimulen la defensa de la planta promovent el metabolisme secundari (Ramirez-Estrada et al., 2016). Per tant, és una alternativa eficient per l'estimulació i producció de taxol en els diferents cultius de *Taxus spp.*, ja que l'elicitació, exerceix un efecte important en l'expressió dels gens involucrats en la biosíntesi de taxol (Barrales-Cureño et al., 2022; Vidal-Limon et al., 2018). Diferents estudis, s'han centrat amb una àmplia gamma d'elicitors per augmentar la producció de taxol (Changxing et al., 2020). A més, ha estat àmpliament estudiada en cultius de cèl·lules i de teixits de *Taxus spp.*, sota diferents condicions d'elicitació però pocs estudis s'han centrat amb cultius cel·lulars de *T. globosa*, tot i que mostra un gran potencial per la producció de taxol (Osuna et al., 2015).

Depenent de l'origen, els elicitors es poden classificar segons siguin abiòtics o biòtics. Els elicitors abiòtics, són factors químics o físics no biològics com sals inorgàniques, sequedat, radiació UV, ultrasò, canvis bruscs de temperatura, dany mecànic, metalls pesats entre d'altres. Pel que fa als elicitors biòtics, són d'origen biològic i poden ser exògens (substàncies d'origen patogènic, és a dir, obtinguts d'organismes vius com els fongs, bacteris, virus) i endògens (compostos produïts per les plantes, com fragments de paret cel·lular i químics que són sintetitzats quan és atacada) (Cusido et al., 2014; Ramirez-Estrada et al., 2016).

Per incrementar la producció de paclitaxel, s'han utilitzat i estudiat nombrosos tipus d'elicitors tant abiòtics com biòtics (Taula 3) i també combinacions entre aquests. Generalment, els cultius de *Taxus spp.*, han estat elicitats amb el jasmonat de metil (MeJA) per produir paclitaxel entre molts d'altres. No obstant, la recerca de nous i més actius elicitors és un dels temes de recerca candents del segle XXI (Cusido et al., 2014), ja que tot i que nombrosos estudis d'elicitació han permès millorar i progressar en la producció de taxol, els rendiments encara segueixen sent baixos (H. R. Vidal-Limon et al., 2018). En aquest context, l'elicitació amb coronatina (COR) o el MeJA combinat amb ciclodextrines (CD), ha demostrat ser més potent que el MeJA per si sol per augmentar la producció de taxol (Cusido et al., 2014).

Recentment, les CD també han cridat l'atenció per la seva capacitat de facilitar la secreció de metabòlits amb baixa hidrosolubilitat de les cèl·lules cap al medi, per tant, aquells cultius tractats amb CD tenen major taxa de secreció de taxol al medi (Ramirez-Estrada et al., 2015). A més, el fet de que CD formi complexos d'inclusió amb el taxol, redueix els efectes inhibitoris de la seva acumulació en la biosíntesi de taxol i ofereix protecció contra la degradació enzimàtica intracel·lular i extracel·lular, podent-se acumular major quantitat d'aquest en el medi de cultiu (Ramirez-Estrada et al., 2015; Almagro i Pedreño, 2020). Altres elicitors utilitzats actualment per augmentar la producció de taxol, són el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), la L-butionina sulfoximina (BSO) (Barrales-Cureño et al., 2022), el polietilenglicol (PEG) (Sarmadi et al., 2019), el nitroprussiat de sodi (SNP) que es un donador d'òxid nítric. Tanmateix, suplementar el medi de cultiu amb diferents fonts de sucres com poliols, mannitol, sorbitol, glucosa i fructosa, poden incrementar la pressió osmòtica del medi i induir estrès osmòtic, resultant en una disminució en l'absorció d'aigua per part dels teixits cel·lulars (Sarmadi et al., 2018). La perfluorodecalina desgasada (PFD_{degas}) també s'ha observat que incrementa la producció de paclitaxel a més que pot facilitar l'extracció *in situ* dels taxans (Sykłowska-Baranek, Grech-Baran, et al., 2015).

La majoria d'elicitors, actuen com a molècules de senyalització, causant estrès oxidatiu ja que condueixen a la sobreproducció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), com el superòxid, singlet d'oxigen, hidroxil i el peròxid d'hidrogen, induint l'expressió d'enzims involucrats en la síntesi

endògena de l'àcid jasmònic i dels seus derivats incloent el MeJA, activant la via de senyalització per sintetitzar taxol (Hasan et al., 2017; Sarmadi et al., 2019; Sarmadi et al., 2020). També s'activen mecanismes antioxidants enzimàtics o no enzimàtics per mitigar els efectes del ROS, ja que un excés de radicals lliures resulta en un dany extensiu a diversos nivells moleculars, incloent la degradació de la membrana lipídica, de proteïnes, d'àcids nucleics i finalment la mort cel·lular reduint així, la producció de paclitaxel (Sarmadi et al., 2018). La resposta variable dels cultius de *Taxus spp.* a l'aplicació dels elicitors no només depèn d'aspectes del propi elicitor, com el tipus, la seva concentració, la duració del tractament, etc., sinó, també depèn de l'espècie, així com la línia cel·lular utilitzada i estat del desenvolupament del cultiu (Ramirez-Estrada et al., 2015). A més, l'efecte de la sinèrgia produït per la combinació d'elicitors, incrementa la síntesi de taxol (Cusido et al., 2014; Barrales-Cureño et al., 2022). No obstant, un dels principals problemes de l'ús dels elicitors en els cultius de *Taxus spp.* és la disminució del creixement i de la biomassa cel·lular (Sarmadi et al., 2019).

Taula 3.- Elicitors abiòtics i biòtics utilitzats per la producció de taxol. Elaboració pròpia a partir de: (Cusido et al., 2014; Amini et al., 2014; Ramirez-Estrada et al., 2015; Sykłowska-Baranek, Grech-Baran, et al., 2015; Vidal-Limon, Almagro, et al., 2018; Chen et al., 2021; Barrales-Cureño et al., 2022).

Elicitors	Tipus	Característiques
Jasmonat de metil	Biòtic	L'aplicació exògena d'aquesta hormona, estimula positivament la ruta biosintètica del metabolisme secundari Efecte perjudicial en la biomassa cel·lular
Coronatina	Biòtic	Fitotoxina produïda per diverses soques de <i>Pseudomonas syringae</i> Actua com una isoleucina-àcid jasmònic, induint la biosíntesis d'àcid jasmònic. Efecte perjudicial sobre la capacitat de creixement de les cèl·lules
Ciclodextrina	Abiòtic	Oligosacàrids cíclics, sent els més comuns els α , β , i γ La seva estructura química és similar a oligosacàrids que són alliberats de la paret cel·lular de la planta quan es produeix una infecció fúngica. Facilita la secreció de taxol de les cèl·lules productores al medi
Àcid salicílic	Biòtic	Hormona endògena molt important de les plantes involucrada en el sistema de defensa, incloent la biosíntesis de metabòlits secundaris
Esqualestatina	Biòtic	Origen fúngic Suprimeix l'activitat de l'esqualè sintasa, incrementant la síntesi de taxans
Quitosa i quitina	Biòtic	La quitina, és un polisacàrid de la paret cel·lular de cadena llarga sintetitzat per un gran nombre d'organismes vius inclosos fongs i llevats. El quitosà, és un derivat de la quitina.
Polietilenglicol	Abiòtic	Polímer no tòxic i no permeable, amb diferents pesos moleculars Si s'afegeix als cultius vegetals, pot reduir l'absorció d'aigua pels teixits mitjançant la disminució del potencial osmòtic en el medi de cultiu
Peròxid d'hidrogen	Abiòtic	Indueix el metabolisme secundari
L-butionina sulfoximina	Abiòtic	És un inhibidor específic de la γ -glutamilcisteïna sintetasa, que bloqueja el pas limitant de la velocitat de la biosíntesi del glutatió, esgotant la reserva intracel·lular d'aquest a les cèl·lules del cultiu, provocant estrès oxidatiu que condueix a la producció de metabòlits

		secundaris com a mecanisme de defensa.
Mannitol, sorbitol, sacarosa, glucosa	Abiòtic	Indueixen estrès osmòtic
Perfluorodecalina	Abiòtic	Fluorocarburi en que tots els àtoms d'hidrogen es substitueixen per àtoms de fluor Immiscible en medi aquós i crea una fase auxiliar per sota de la fase aquosa del medi de cultiu on es poden trobar alguns dels taxans produïts. Això suggereix que pot ser una estratègia eficaç per l'extracció <i>in situ</i> de taxans
Nitroprussiat de sodi	Abiòtic	Donador d'òxid nítric Està implicat en la senyalització de respostes de defensa durant les interaccions planta-patogen

5.3.3. Estratègies d'elicitació en cultius cel·lulars i de cal·lus de *Taxus spp.* amb elicitors biòtics

Quitosa i quitina

Cultius cel·lulars en suspensió de *T. chinensis* suplementats amb quitosa i quitina per separat, incrementen la producció de paclitaxel, mentre que en cultius cel·lulars de *T. canadiensis* l'efecte del MeJA augmenta degut a la presència d'aquests polisacàrids, fet que també s'observa en cultius cel·lulars de *T. chinensis*. Per tant, el quitosa incrementa la resposta als diferents tractaments d'elicitació (Ramirez-Estrada et al., 2016).

Jasmonat de metil (MeJA)

Actualment, l'addició de MeJA als cultius cel·lulars de *Taxus spp.* és una de les estratègies d'elicitació més efectives per incrementar la producció de taxol i d'altres taxoides (Sabater-Jara et al., 2014; Barrales-Cureño et al., 2022). S'ha reportat que l'addició de 200 µM de MeJA en cultius cel·lulars en suspensió de *Taxus spp.*, produeix 23,4 mg/L de taxans, dels quals, un 20% és taxol. A més, si s'afegeixen 100 µM de fructosa, augmenta la producció a 17,07 mg/L de taxol (Changxing et al., 2020). En un altre estudi amb cultius cel·lulars de *T. baccata*, si s'afegeixen 100 µM de MeJA, s'observa un augment de 19 vegades la producció de taxol en comparació amb el control (Cusido et al., 2014).

En un sistema de dues fases d'un cultiu cel·lular de *T. globosa*, s'estudia l'efecte de l'elicitació amb 100µM de MeJA tant amb un cultiu lliure en suspensió com en un cultiu amb cèl·lules immobilitzades amb perles d'alginat. L'addició del MeJA en les cèl·lules lliures en suspensió, indueix un increment dramàtic en la producció de taxans (Figura 5) sobretot sota el medi T2, que està compost per B5 amb PIC, KN i GA₃. En aquest medi, el taxol representa un 87% dels taxans produïts (Osuna et al., 2015).

El dia 35 del cultiu, s'assoleixen 503 µg/L de taxol, mentre que si s'aplica el MeJA en cèl·lules immobilitzades amb perles d'alginat, la producció de taxol és de 436,336 µg/L, no obstant, encara que la producció sigui inferior, presenta dues vegades més productivitat que les cèl·lules lliures en suspensió, just 3 dies després de l'elicitació (Taula 4) (Osuna et al., 2015). Tot i així, en ambdós casos, la resposta a la presència de l'elictor és més elevada en aquells cultius amb condicions menys productives (medi T2), que aquells que tenen més capacitat per produir i acumular taxans. Pel que fa a la capacitat de secreció de taxans, els cultius cel·lulars en suspensió lliures mostren una capacitat variable d'alliberar els taxans al medi de cultiu i el percentatge depèn del tipus de taxà i del temps de cultiu (Osuna et al., 2015).

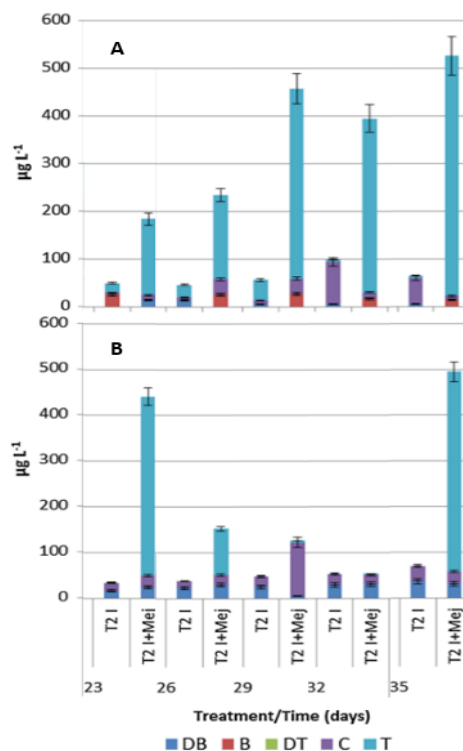


Figura 5.- Producció total de taxans en cèl·lules *T. globosa* lliures (A) i immobilitzades (B) durant la segona fase del cultiu en el medi T2 amb o sense jasmonat de metil (MeJ a la figura). DB: 10-desacetilbaccatina III; B: baccatina III; DT: 10-desacetiltaxol; C: cefalomanina; T: taxol. Font: (Osuna et al., 2015).

Taula 4.- Concentració de taxol i productivitat dels cultius cel·lulars de *T. globosa* lliures i immobilitzats el dia 3 de l'addició del jasmonat de metil (MeJA). Elaboració pròpia a partir de: (Osuna et al., 2015).

Dia	Tipus tractament	Concentració (µg/L)	Cèl·lules lliures	Concentració (µg/L)	Cèl·lules immobilitzades
			Productivitat (µg/L·dia)		Productivitat (µg/L·dia)
23 (dia 3 elicitació)	Medi T2 + MeJA	159,95 ± 0,99	53,32 ± 1,47	391,04 ± 7,83	130,35 ± 9,68

Àcid salicílic (SA)

Nombrosos estudis s'han realitzat per estudiar l'efecte de l'elictor SA per incrementar la producció de taxol i taxans a *Taxus spp.* En cultius de cèl·lules en suspensió de *T. chinensis* s'ha observat que la condició òptima per induir la producció de paclitaxel és de 20 mg/L de SA (Ramirez-Estrada et al., 2016; Chen et al., 2021), i que l'addició de 0,1 mg/L de SA pot augmentar la producció de taxol fins a 3 vegades més que el control (Chen et al., 2021).

Jasmonat de metil (MeJA) conjuntament amb àcid salicílic (SA)

En cèl·lules en suspensió de *T. cuspidata*, quan es combinen 100 µmol/L de MeJA, 20 mg/L de SA, 400 mg/L de PHE i 2 mg/L de GA₃ s'obté una producció de taxol de 4,855 mg/L (S. Wang et al., 2016).

Jasmonat de metil (MeJA) conjuntament amb àcid làuric (LA)

El LA és un solvent orgànic, utilitzat per l'extracció *in situ* de paclitaxel, que forma una altra fase a part del medi on es pot acumular el paclitaxel, disminuint així, la concentració d'aquest al medi, de manera que es redueix la inhibició del creixement de cal·lus o cèl·lules per la presència del taxol, augmentant significativament la productivitat d'aquest. En un sistema de dues fases amb un cultiu de cal·lus de *T. cuspidata*, l'efecte d'un 10% de LA sobre la productivitat del taxol és de 0,023 mg/L·dia. Amb aquestes mateixes condicions, la concentració de taxol al medi de cultiu, és de 0,018 mg/L i a la fracció que conté el LA és de 0,042 mg/L, mentre que en el control hi ha 0,032 mg de taxol/L. Per tant, la producció total de paclitaxel és lleugerament superior en el medi que conté LA que en el control, això és degut a que el cultiu que conté LA, produeix una altra fase en el medi on també hi ha paclitaxel, disminuint la concentració d'aquest en el medi de cultiu. Aleshores, provoca que la presència de taxol en el medi sigui inferior a la concentració inhibidora del creixement de cal·lus de *T. cuspidata*, reduint-se el feedback inhibitori del paclitaxel i millorant l'activitat cel·lular i enzimàtica, augmentant-se la biosíntesi d'aquest. Per tant, l'extracció *in situ* amb LA promou la síntesi de paclitaxel (Yamamoto, Taura, et al., 2014). Actualment, també està sota estudi, afegir elicitors juntament amb el LA per incrementar la producció de taxol, com ha estat el cas del MeJA. En un cultiu de dues fases de *T. cuspidata* amb 10 vol% de LA i 10 mM MeJA, s'han obtingut 0,56 µg de taxol/pes fresc cel·lular. En un altre cultiu de *T. baccata*, 0,1 mM de MeJA amb LA, dona lloc a 52,3 µg de taxol/pes fresc cel·lular, mentre que en el control s'obtenen 0,56 µg/ pes fresc cel·lular de taxol, aquestes diferències de producció obtingudes entre *T. cuspidata* i *T. baccata* són degudes a la línia cel·lular. Per tant, finalment, s'observa que el LA incrementa la producció de taxol en un sistema de cultiu de dues fases i per incrementar encara més la producció de taxol, s'hauria d'estudiar l'efecte d'augmentar la fracció de volum de LA i/o de la concentració de MeJA (Yamamoto, Koga, et al., 2014).

Coronatina (COR) conjuntament amb nanopartícules calix[8]arens (CAL)

En un estudi recent per incrementar la producció de taxol en un cultiu en suspensió de dues fases de *T. media*, s'estudia l'efecte de les nanopartícules CAL, que són de gran interès en la nanomedicina amb una eficiència d'unió a paclitaxel del 90,3% ja que poden portar compostos lipòfils (Escrich et al., 2021).

Per una banda, si s'utilitza 1 μM de COR incrementa 8 vegades la producció total de taxans en comparació al control. D'altra banda, l'addició 10 mg/L de CAL indueix 15 vegades el contingut de taxans, indicant l'efecte sinèrgic entre els dos compostos. A més a més, millora el percentatge de secreció de taxol al medi del 89 al 98%, indicant que CAL té un efecte positiu en la secreció de taxans però només en presència de COR. Pel que fa al impacte de la producció de taxol (Figura 6), quan s'utilitza només COR s'obtenen fins a 42,3 mg/L de taxol. No obstant, és quan s'administra COR juntament amb CAL que s'obtenen fins a 85 mg/L de taxol al final de l'experiment, essent 23 vegades superior al control (Escrich et al., 2021). En aquest estudi, s'obtenen resultats molt similars als aconseguits amb cultius de *Taxus spp.*, tractats amb COR i CD o bé MeJA amb CD. Això, és degut a que CAL igual que la CD, protegeix la viabilitat cel·lular del impacte negatiu de la COR en la biomassa cel·lular, probablement perquè actua formant complexos amb el taxol, augmentant la seva solubilitat,

facilitant la seva secreció al medi i protegint-lo de la degradació enzimàtica. Tot i així, CAL, no actua com a elicitor, ja que la seva aplicació al medi, no augmenta pràcticament l'expressió dels gens implicats en la formació de paclitaxel (Escrich et al., 2021).

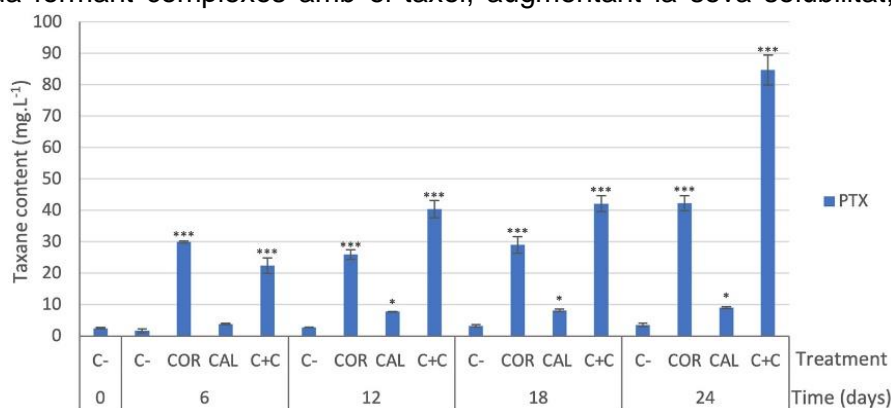


Figura 6.- Efecte de la coronatina (COR) i les calix[8]arens (CAL), administrades per separat o conjuntament, en la producció de paclitaxel en cultius cel·lulars de *T. media* cultivats durant 24 dies en un medi de producció. PTX: paclitaxel; C+C: coronatina i calix[8]arens. Diferències significatives de <0,05 (*), <0,005 (**), <0,001 (***). Font: (Escrich et al., 2021).

Esqualestatina

Quan s'aplica 1 i 0,1 μM d'esqualestatina en un cultiu cel·lular de *T. baccata*, augmenta la producció de taxol a 1,87 i 2,47 mg/L respectivament. La màxima concentració de taxol extracel·lular (1,32 mg/L) s'obté amb 1 μM d'esqualestatina que correspon al 71, 26% del taxol total amb aquest tractament. Per contra, sota el tractament de 0,1 μM d'esqualestatina augmenta el taxol intracel·lular (Amini et al., 2014).

5.3.4. Estratègies d'elicitació en cultius cel·lulars i de cal·lus de *Taxus spp.* amb elicitors abiòtics

L- Butionina sulfoximina (BSO) combinat amb peròxid d'oxigen (H₂O₂)

Cultius en suspensió de *T. globosa*, s'observa que l'aplicació exògena de 0,8 µM de BSO i 0,2 µM de H₂O₂ augmenta la producció de taxol (Taula 5) degut al efecte sinèrgic dels dos elicitors (Barrales-Cureño et al., 2022).

Taula 5.- Producció de taxol obtingut de les cèl·lules en suspensió de T. globosa sota el tractament amb L-butionina sulfoximina (BSO) i peròxid d'hidrogen (H₂O₂). Elaboració pròpia a partir de: (Barrales-Cureño et al., 2022).

Taxoide	Tractament	Dia	Producció (µg/g de pes sec)
Taxol	BSO+H ₂ O ₂	6	86,78
Taxol	BSO+H ₂ O ₂	8	84,2
Taxol	BSO+ H ₂ O ₂	10	157

Polietilenglicol (PEG)

Estudis dels efectes que exerceixen els estressos ambientals en la producció de taxol en cultius de *Taxus spp* encara són insuficients, com l'estrès per sequera, que pot ser una alternativa efectiva per incrementar el taxol en cultius cel·lulars. Això, es pot aconseguir amb l'aplicació d'una concentració lleu o moderada de PEG, precisament, d'un 3%. Quan s'aplica un 3% de PEG en un cultiu de cal·lus de *T. baccata*, s'obté 59.84 µg de taxol/g de pes sec, mentre que si s'aplica un 6%, la concentració de taxol tendeix a disminuir. Per tant, es pot utilitzar PEG com a compost no tòxic, econòmic i fàcil d'utilitzar per augmentar la producció de taxol en cultius de cèl·lules *Taxus spp.* No obstant, encara falten més estudis per conèixer l'efecte de PEG (Sarmadi et al., 2019).

Agents osmòtics : sorbitol, manitol i sacarosa

L'ús d'agents osmòtics, com sorbitol, manitol i sacarosa de forma individual o conjunta, pot causar estrès osmòtic i així, alterar els nivells de paclitaxel. En cultius cel·lulars de *T. baccata*, la producció de taxol augmenta a nivells baixos i moderats d'agents osmòtics (Figura 7). La màxima concentració de paclitaxel s'obté després d'un tractament amb 3% de manitol, resultant en 3 vegades més taxol que el control. També s'obtenen elevats nivells de taxol amb 2% de sorbitol i 6% de sacarosa. Mentre, que la concentració de taxol disminueix amb tractaments amb major concentració d'agents osmòtics (Sarmadi et al., 2020).

En un altre estudi, un tractament amb 6% de sacarosa en un cultiu cel·lular de *T. chinensis* s'obtenen dues vegades més taxol que el control. Per tant, els nivells controlats d'estrès osmòtic, poden ser un enfocament útil per obtenir rendiments més alts de paclitaxel en cultius cel·lulars en suspensió a nivell de bioreactor (Sarmadi et al., 2020).

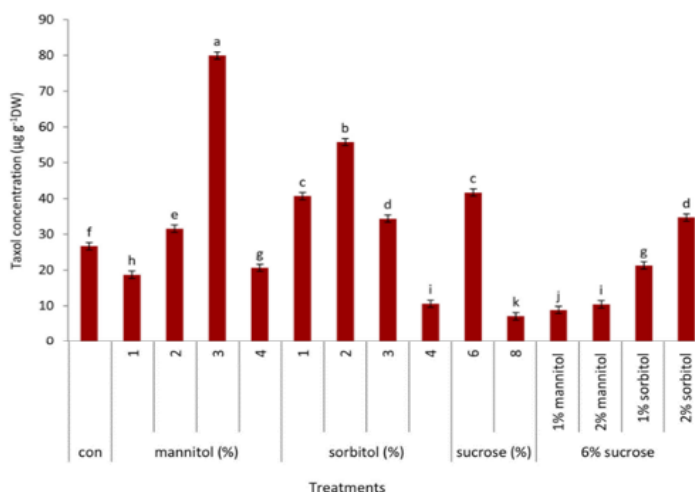


Figura 7.- Concentració de paclitaxel sota estrès osmòtic en cultiu de cal·lus de *T. baccata* després de 21 dies de cultiu. Con control. Les diferents lletres indiquen diferències significatives entre mitjanes. Font: (Sarmadi et al., 2020).

5.3.5. Estratègies d'elicitació en cultius cel·lulars i de cal·lus de *Taxus spp.* amb l'ús conjunt d'elicitors biòtics i abiòtics

Ultrasò (US) combinat amb àcid salicílic (SA) o bé amb jasmonat de metil (MeJA)

Els banys ultrasònics, generen ones ultrasòniques de 20-400 kHz, si s'aplica una exposició curta i amb poca potència d'US en un cultiu cel·lular de *T. chinensis*, incrementa la producció de taxol (Hasan et al., 2017). Quan es combina el MeJA amb l'US, s'observen efectes sinèrgics entre aquests dos, augmentant la síntesi de taxol. El mateix s'observa quan les cèl·lules es tracten amb US i SA, ja que amb 50 mg/L de SA i 40 kHz d'US durant 2 minuts produeix fins a 8 vegades més taxol que en el control (Changxing et al., 2020). Per tant, la combinació del US amb MeJA o SA augmenta més la producció de taxol (Taula 6) en comparació de si es tracten els cultius cel·lulars amb els elicitors per separat. Tot i així, encara es requereixen més estudis per implementar un sistema d'US per aconseguir una producció de taxol a gran escala (Hasan et al., 2017).

Taula 6.- Acumulació de taxol en resposta a l'ultrasò (US) a 38,5–40 kHz o el seu efecte combinat amb el jasmonat de metil (MeJA) o àcid salicílic (SA). Elaboració pròpia a partir de: (Hasan et al., 2017).

Tractament (US, MeJA/SA)	US +	Temps de tractament	Inducció
US		2	2 vegades més taxol que el control
US + MeJA (60 mM)		2	2,5 vegades més taxol que el control
US + SA (50 mg/L)		2	8 vegades més taxol que el control

Coronatina (COR) conjuntament amb β -ciclodextrina (β -CD)

Optimitzant la producció de taxol i taxans amb els elicitors COR i β -CD metilada aleatòriament, s'ha augmentat la producció de taxans fins a 40 vegades més que el control en cultius cel·lulars de dues fases de *T. globosa* obtenint-se més de 35 g/L de taxol (Figura 8), essent el tractament més

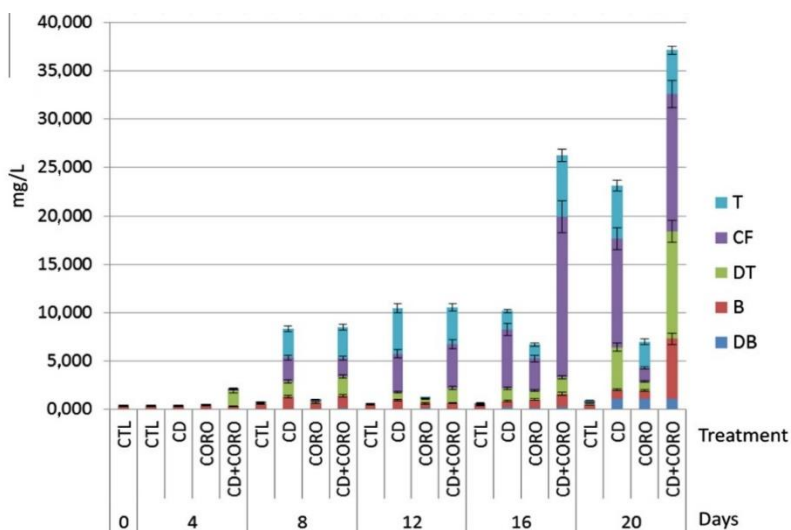


Figura 8.- Contingut de taxans extracel·lulars en cultius cel·lulars de *T. globosa* cultivats durant 20 dies en condicions de control i amb l'addició de ciclodextrina (CD) i coronatina (CORO a la figura) o ambdós elicitors junts. CTL: control; DB: 10-desacetilbaccatina III; B: baccatina III; DT: 10-desacetiltaxol; CF: cefalomanina; T: taxol. Font: (Ramirez-Estrada et al., 2015).

efectiu la combinació de 1 μ M de COR amb 50 mM de β -CD, tot i que també s'obtenen nivells de taxol elevats amb CD el dia

20 del cultiu. El mateix tractament (CD i COR), s'ha aplicat a *T. x medía* transgènic per la TXS de *T. baccata*. Aquest, encara que produeix una major concentració de taxol, *T. globosa*, presenta una major capacitat de secreció de taxans al medi, sent el taxol un dels principals taxans acumulat al medi. A més, en aquest estudi, l'efecte dels elicitors sobre la producció de taxans individuals a *T. globosa*, no es va poder determinar a causa de les escasses quantitats que es troben dins de les cèl·lules productores (Ramirez-Estrada et al., 2015).

Pel que fa a la capacitat cel·lular de secretar taxans al medi per part de *T. globosa*, el tractament amb CD ja sigui sola o amb menor mesura amb combinació amb la COR, indueix un elevat alliberament d'aquests al medi, especialment quan la producció de taxans és elevada (de 12 a 20 dies de cultiu), ja que la β -CD, actua com a agent permeabilitzant i millora la secreció de taxol al medi líquid. També contraresta els efectes negatius que exerceix la COR sobre el creixement cel·lular. Aquests resultats, suggereixen un possible efecte sinèrgic entre els dos elicitors per la producció de taxol, com ja s'havia observat prèviament amb la CD i el MeJA en els cultius cel·lulars de *T. medía* (Ramirez-Estrada et al., 2015).

Coronatina (COR) juntament amb β -ciclodextrina (β -CD) i perfluorodecalina (PFD)

En un cultiu cel·lular de *T. medía*, s'observa que si s'aplica 50 μ M de β -CD amb 1 μ M de COR i 575 ml/L de perfluorodecalina desgasada (PFD_{degas}), és la millor condició per la síntesi total de taxans (Figura 9), ja que la seva producció millora en un 230% en comparació amb el control. A més, es produeix un increment molt elevat de la seva secreció al medi en comparació amb el control, ja que gairebé la meitat dels taxans amb cadena lateral com el taxol, es troben a la

fase PFD, havent un 50% de taxol. La presència del taxol a la fase PFD_{degas} podria evitar els efectes negatius que aquest exerceix sobre el creixement cel·lular i així, s'augmentaria la producció de taxol i taxans. Per tant, el PFD_{degas} és un elicitor eficient per la producció de taxol en els cultius de cèl·lules de *Taxus spp.*, tot i que pel seu efecte d'inducció, és essencial la co-presència de la COR i β -CD (H. R. Vidal-Limon et al., 2018).

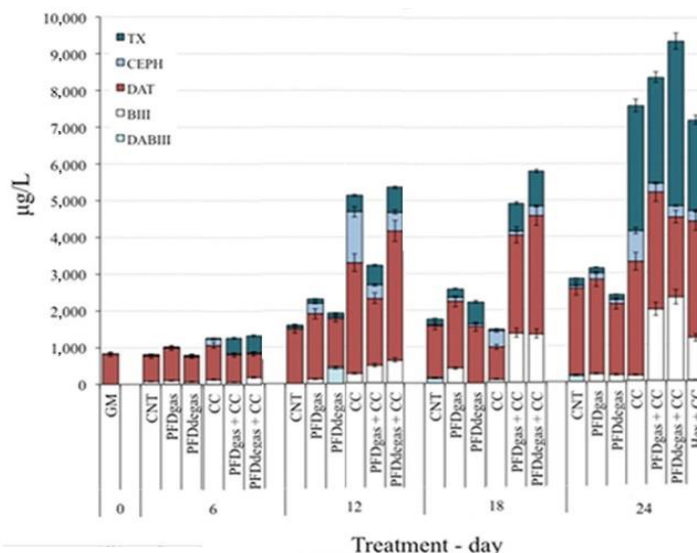


Figura 9.- Producció individual de taxans en cultius cel·lulars de *T. media* amb l'elicitació de perfluorodecalina desgasada (PFD_{degas}), coronatina (COR) i ciclodextrina (CD). GM: medi de producció de biomassa; CNT: control; PFD_{gas}: perfluorodecalina gasejada; CC: coronatina i ciclodextrina; TX: taxol; CEPH: cefalomanina; DAT: 10-desacetiltaxol; DABIII: 10-desacetilbaccatina III. Font: (Vidal-Limon, Almagro, et al., 2018).

Àcid salicílic (SA) combinat amb glucosa

En diversos estudis, s'ha augmentat la producció de taxol en cultius cel·lulars de *T. chinensis* en resposta a l'estrès osmòtic causat per sacarosa i mannitol. Tanmateix, per primera vegada, s'estudia l'efecte de pre-tractar un cultiu de cal·lus amb 5 µM de SA i posteriorment cultivar-lo en un medi que conté diferents nivells de glucosa (0,5%, 1%, 2% i 3%) per causar estrès osmòtic i augmentar la producció de taxol. Quan els cal·lus són sotmesos a les diferents concentracions de glucosa, augmenta la producció de paclitaxel. No obstant, aquest, és més elevat amb un 2% i disminueix a partir del 3% de glucosa. Quan els cal·lus, a més, es tracten amb SA, els nivells de taxol augmenten, hi hagi o no glucosa. Quan es combinen 5 µM SA i 2% de glucosa produeix un increment molt elevat de taxol, essent 5,1 vegades superior al control, ja que el pre-tractament dels cal·lus amb SA incrementa la resistència a l'estrès oxidatiu i protegeix contra els efectes destructius d'estrès osmòtic en el creixement i viabilitat cel·lular causat per la glucosa. Per tant, l'aplicació combinada d'aquests elicitors té potencial com un mètode simple i econòmic per produir taxol en cultius cel·lulars en suspensió i en bioreactors industrials a escala comercial (Sarmadi et al., 2018).

5.4. Enginyeria metabòlica per la producció de taxol

Encara que només hi ha pocs informes sobre la transformació genètica de *Taxus spp.* (Cusido et al., 2014), l'enginyeria metabòlica, és un mètode prometedor amb elevat potencial per incrementar la productivitat de varis metabòlits secundaris com el taxol amb una àmplia

aplicació futura (Sabzehzari et al., 2020; Yang et al., 2020). L'enginyeria metabòlica, pot ser executada de forma directa o bé, holística. El primer, es basa en introduir gens al genoma del hoste per controlar la ruta biosintètica, ja sigui augmentant l'activitat d'un determinat pas metabòlic o bé disminuint-lo en el cas que sigui un pas no desitjat. Pel que fa al enfocament holístic, el gen forà inserit codifica per un factor de transcripció o una proteïna reguladora, que permet controlar simultàniament diverses vies biosintètiques. L'enginyeria metabòlica, també és aplicable per obtenir microorganismes i plantes heteròlegs, és a dir, que siguin capaços de sintetitzar taxol (Cusido et al., 2014).

El principal repte de l'enginyeria metabòlica per modular la producció de taxol en cultius in vitro de *Taxus spp.* és la dificultat de transformar genèticament el teix ja que és de naturalesa gimnosperma i de creixement lent. No obstant això, l'any 1994, es transforma genèticament *T. brevifolia* i *T. baccata* utilitzant *Agrobacterium tumefaciens* per desenvolupar cultius de cal·lus transformats. Més tard, per primera vegada s'estableix un cultiu de *hairy roots* de *Taxus spp.* amb *Agrobacterium rhizogenes*, malgrat això, la producció de taxans i taxol era baix i de creixement lent i per tant, el sistema era inadequat per la producció a escala industrial. Tot i així, cultius de *hairy roots* de *T. x media* elicitats amb MeJA i alimentats amb els precursors PHE i àcid benzoic va incrementar significativament la producció de taxol. La primera aplicació d'enginyeria metabòlica amb un resultat exitós per la producció de taxol, va ser l'obtenció de cultius cel·lulars de *T. marei* que sobreexpressaven constitutivament els gens *DBAT* i *TXS*, encara que aquesta producció, depenia de l'elicitació amb MeJA (Cusido et al., 2014; Changxing et al., 2020). Nombrosos estudis, s'han centrat en la introducció del gen *TXS*, que catalitza el primer pas de ciclació compromès de la via biosintètica dels taxans sol o juntament amb el gen *DBAT*, que és el que converteix la 10-DAB III en B III. Aquestes modificacions d'enginyeria metabòlica han permès una acumulació de taxans significativament més elevada a les línies cel·lulars transgèniques que a les no transgèniques (Sykłowska-Baranek, Pilarek, et al., 2015). Més recentment, s'han desenvolupat cultius de *hairy roots* de *T. x media* que sobreexpressen el gen *TXS* de *T. baccata* (Cusido et al., 2014). Aquests cultius transformats s'obtenen després de la inoculació de plàntules de *Taxus spp.* amb *A. tumefaciens* portadora del plasmidi RiA4 de *A. rhizogenes* i del plasmidi que alberga el gen *TXS*. A més, aquests tipus de cultius, es poden desdiferenciar i obtenir suspensions cel·lulars. En general, la presència del T-DNA d'*A. rhizogenes* i la sobreexpressió del gen *TXS*, que, no sembla ser un gen limitant per la producció de taxol, augmenten la seva producció, sobretot amb presència d'elicitors (Cusido et al., 2014; Sykłowska-Baranek et al., 2019).

L'objectiu d'una altra estratègia metabòlica, és la de bloquejar els punts de ramificació de la biosíntesi de taxol mitjançant la supressió induïda antisentit del taxoide 14 β -hidroxilasa en línies cel·lulars transgèniques de *T. media*, ja que aquest enzim, catalitza taxans oxigenats C-

14, no precursors del taxol i que es formen a través d'una via que pot competir amb el taxol pels precursors. Aquest mètode, també seria útil per inhibir l'expressió d'altres gens importants de vies laterals de la ruta biosintètica del taxol. També s'ha estudiat la possibilitat del bloqueig de les vies metabòliques competitives, mitjançant el sistema CRISPR/Cas9 i la tecnologia miRNA. L'aproximació aconseguida fins ara, ha estat la regulació negativa de la síntesi de taxol a *T. baccata* amb miR171 i miR164, ja que aquests miRNA tenen afinitat per dos enzims importants de la síntesi de taxol (Sabzehzari et al., 2020). L'enginyeria metabòlica del taxol, també s'ha abordat holísticament, ja que prèviament, s'havia demostrat, que l'ozó, induïa la producció de taxans en cultius cel·lulars de *T. chinensis* i la resposta depenia parcialment de la senyalització de l'àcid abscísic (ABA). Aleshores, línies cel·lulars transgèniques de *Taxus spp.* s'han modificat per sobreexpressar l'enzim dioxigenasa 9-cis-epoxycarotenoide, responsable de l'eliminació del 9-cis-epoxycarotenoide, un pas limitant de la biosíntesi de l'ABA. La seva sobreexpressió, produeix un increment de l'acumulació d'ABA i taxol a les línies cel·lulars transgèniques (Cusido et al., 2014).

Per una banda, altres enfocaments possibles en estudi per millorar la producció de paclitaxel i obtenir cultius cel·lulars altament productius, és la sobreexpressió de gens que codifiquen per enzims implicats en la ruta biosintètica del taxol que catalitzen una sèrie de passos importants d'hidroxilació i acetilació com per exemple, la 13-diacetilbaccatina III-2-O-benzoil-transferasa, 5-alfa-taxadienol-10-beta-hidroxilasa, taxadiè 5-alfa hidroxilasa, entre d'altres. Això, s'ha confirmat a *T. wallichiana*, ja que, s'observa un contingut aproximadament 3 vegades superior de taxol a aquelles plantes que sobreexpressen aquests gens. D'altra banda, s'ha observat també, que els elicitors normalment augmenten l'expressió dels gens involucrats en les primeres etapes de la biosíntesi dels taxans, mentre que aquells que estan involucrats en les últimes etapes estan menys induïts com el *DBAT*, el gen que codifica per la baccatina III 13-O-3-amino-3-fenilpropanoil transferasa (*BAPT*) i el gen que codifica per la 30-N-debenzoil-20-desoxitaxol-N-benzoiltransferasa (*DBTNBT*), per tant, aquests gens involucrats en les últimes etapes de biosíntesi dels taxans podrien ser objectiu d'estudis d'enginyeria metabòlica que intentarien la seva sobreexpressió en línies transgèniques de *Taxus spp* (H. Vidal-Limon et al., 2018).

5.4.1. Producció de taxol en cultius cel·lulars de *T. x media* que contenen el gen *TXS* de *T. baccata*

Jasmonat de metil (MeJA) juntament amb β -ciclodextrina (β -CD)

En un cultiu en suspensió de dues fases, s'observa que el tractament simultani amb 50 mM de β -CD metilada aleatòriament i 100 μ M de MeJA al dia 16 de la incubació incrementa la

producció de taxol (Figura 10), comparat amb el control o bé quan el cultiu és tractat amb un dels elicitors (Cusido et al., 2014; Sarmadi et al., 2018). El tractament previ amb CD redueix l'efecte negatiu del MeJA sobre la biomassa cel·lular, ja que és bastant similar a la del control. A més, produeix 6,1 vegades més taxans, dels quals, 65,01 mg/L

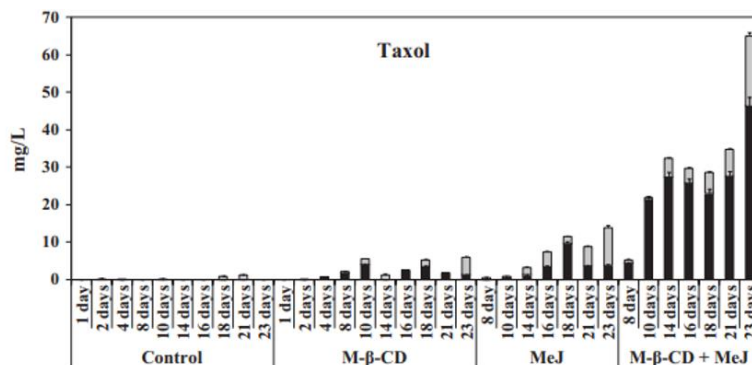


Figura 10.- Contingut total de taxol en cultius cel·lulars de *T. media* elicitat amb ciclodextrina metilada aleatòriament ($M\text{-}\beta\text{-CD}$ a la figura) i jasmonat de metil (MeJ a la figura) per separat o combinats durant 23 dies. Part negra de les barres: taxol extracel·lular; part grisa de les barres: taxol intracel·lular. Font: (Sabater-Jara et al., 2014).

és taxol. Demostrant, que els dos elicitors poden actuar sinèrgicament en la producció i acumulació de taxans, concloent que l'acció conjunta del MeJA i de la CD indueix una reprogramació important en l'expressió gènica dels cultius de *T. x media* que dona lloc a l'augment en la producció de taxol. A més, l'addició de la $\beta\text{-CD}$ al cultiu cel·lular, incrementa no només la producció de taxol sinó també la seva secreció al medi de cultiu, ja que forma complexos d'inclusió amb aquest, disminuint la retroinhibició del taxol, la toxicitat cel·lular i preveient la possible degradació enzimàtica tant intracel·lular com extracel·lular (Sabater-Jara et al., 2014).

Coronatina (COR) juntament amb β -ciclodextrina ($\beta\text{-CD}$)

En un cultiu cel·lular de dues fases, la combinació d'1 μM de COR amb 50 mM de $\beta\text{-CD}$ produeix una màxima producció de taxans els dies 12 i 16 després de l'elicitació. En general, en els cultius de *T. x media*, es produeix una major quantitat de taxans i de taxol que pel mateix tractament a *T. globosa*, però presenta menys capacitat de secreció al medi. En totes les condicions estudiades, el taxol, és el major taxà associat a les cèl·lules, tot i que amb el tractament de CD i COR, augmenta la capacitat de secreció d'aquest al medi, ja que

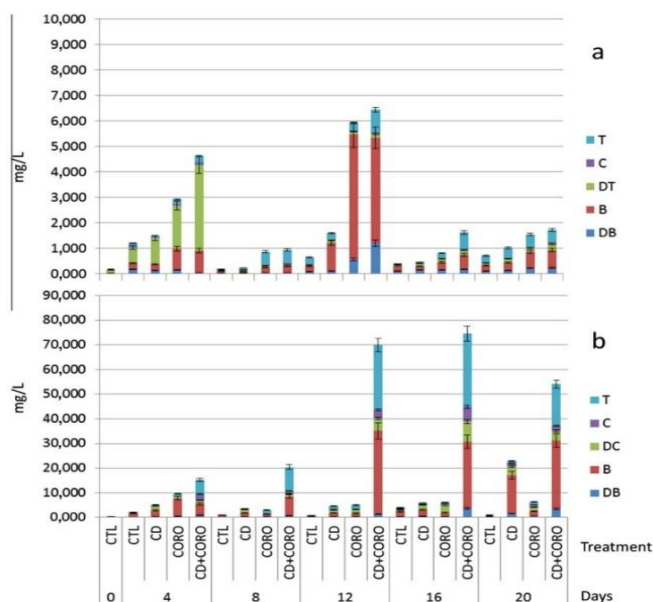


Figura 11.- Contingut individual de taxans en cultius cel·lulars de *T. media* en condicions de control (CTL) i amb l'addició de ciclodextrina (CD), coronatina (CORO a la figura) o ambdós elicitors junts. (a) Taxans intracel·lulars. (b) Taxans extracel·lulars. DB 10-desacetilbaccatina III; B baccatina III; DT 10-desacetiltaxol; CF cefalomanina; T taxol. Font: (Ramirez-Estrada et al., 2015).

la màxima acumulació de taxans intracel·lulars representa menys d'un 10%. Aquests resultats, igual que a *T. globosa*, suggereixen un possible efecte sinèrgic entre els dos elicitors per la producció de taxol, a més de que les CD tenen un efecte similar sobre la capacitat d'alliberar els taxans formats intracel·lularment al medi de cultiu (Ramirez-Estrada et al., 2015).

5.4.2. Producció de taxol en cultius de *hairy roots* de *T. x media* que contenen el gen *TXS* de *T. baccata*

Medi suplementat amb perfluorodecalina (PFD) juntament amb jasmonat de metil (MeJA) o coronatina (COR)

En un sistema de dues fases, suplementant el medi amb 100 µM de MeJA juntament amb sacarosa i PHE indueix una major producció de taxol que quan s'afegeix només 1 µM de COR. No obstant, quan el dia 0 i 14 del cultiu, es suplementa el medi amb PFD_{degas}, i a més s'elicitava amb MeJA juntament amb sucrosa extra i PHE, el dia 42 del cultiu, s'obté la major quantitat de paclitaxel a la biomassa de les arrels, sent de 1.440,8 i 1.432,5 µg/g de pes sec de taxol, respectivament sense cap reducció significativa del creixement de les arrels. Pel que fa al medi que conté COR i PFD_{degas}, encara que també estimula la producció de paclitaxel ho fa en menor mesura que el MeJA, tot i que mostra una major taxa de secreció de taxol. Per tant, aquests resultats suggereixen que un sistema que aprofita el PFD, millora la productivitat de paclitaxel i d'altres taxans, ja que s'obtenen concentracions més elevades de paclitaxel quan s'utilitza juntament amb altres elicitors (Sykłowska-Baranek, Pilarek, et al., 2015).

Efecte de l'elicitació amb jasmonat de metil (MeJA) i nitroprussiat de sodi (SNP)

En un estudi, per una banda, al afegir 100 µM de MeJA i 100 µM de PHE, condueix a la màxima producció de paclitaxel després d'una setmana d'elicitació (10,78 mg/L de paclitaxel). A més, si s'afegeix al medi sacarosa, augmenta la concentració de paclitaxel extracel·lular, que és 2,34 mg/L. D'altra banda, l'addició de 10 µM SNP com a elicitor, només produeix taxol sinèrgicament amb combinació amb el MeJA sol o bé amb el MeJA i PHE, que és quan s'obté la màxima concentració de paclitaxel amb presència de SNP, oscil·lant fins a 7,56 mg/L (Sykłowska-Baranek, Grech-Baran, et al., 2015).

Medi suplementat amb perfluorodecalina (PFD) juntament amb jasmonat de metil (MeJA) i nitroprussiat de sodi (SNP)

En un altre estudi realitzat en cultius de dues fases per (Sykłowska-Baranek et al., 2019), la suplementació al medi amb 100 µM MeJA, 10 µM SNP, 100 µM de PHE i 30g/L de sacarosa en un cultiu que conté PFD_{degas}, es produeixen 503,11µg de taxol/matràs, després de dues setmanes de l'elicitació, que correspon a 2.473,29 µg de taxol/g de pes sec. No obstant, pel

que fa al taxol extracel·lular, tant en medi aquós com a la fase PFD_{degas}, no excedeix del 10%. En aquest estudi, el sistema de dues fases amb el medi de cultiu amb la fase aquosa i el PFD_{degas} s'identifica com el factor crucial per la millora de la producció de paclitaxel, tot i que en aquest cas, el PFD no actua com a elicitor, només com a fase per l'acumulació dels taxans, ja que crea una fase d'extracció *in situ* que pot contrarestar els efectes supressors del creixement degut a l'acumulació de paclitaxel al medi (Sykłowska-Baranek et al., 2019).

5.4.3. Producció heteròloga de taxol

La dificultat de transformar genèticament *Taxus spp.*, ha inspirat altres enfocaments, com la producció de taxol en organismes heteròlegs. Fins el moment, encara no s'ha completat la síntesi de taxol en organismes heteròlegs, no obstant això, encara que la ruta biosintètica del taxol sigui complexa, s'ha assolit la transferència d'una part d'aquesta a diferents microorganismes i plantes. S'han utilitzat com a hostes per la producció de taxadiè i altres intermediaris *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* entre d'altres. El taxadiè, s'ha produït amb bastant èxit, tot i així, els intents per produir l'intermediari taxadiè-5 α -ol no ha mostrat bons resultats. En *E. Coli* s'ha obtingut 1 g/L de taxadiè a través e l'optimització del procés. Pel que fa a *S. cerevisiae*, és més adequat per produir intermediaris de la biosíntesi del taxol que a *E. coli*, l'expressió de *TXS* i altres optimitzacions, han conduït a l'obtenció de 72,8 mg/L de taxadiè. La sobreexpressió de *TXS* i *GGP sintasa* a *A. thaliana*, a arribat a produir 600 ng taxadiè/g de pes sec. Pel que fa a *N. benthamiana*, s'ha arribat a produir 56,6 μ g/g de pes fresc de taxadiè (Sabzehzari et al., 2020).

6. DISCUSSIÓ

Aquesta revisió bibliogràfica ha permès adquirir, una millor perspectiva de l'estat actual de la producció de taxol i com pot avançar en un futur. La lluita contra el càncer és i continuarà sent durant les properes dècades una de les principals batalles humanes. Tot i que per una banda, augmenta l'eficàcia dels nous fàrmacs, d'altra banda, el càncer continua sent una de les primeres causes de mortalitat i el taxol juntament amb la resta de compostos derivats d'aquest han estat i continuen sent molt necessaris i eficaços per la lluita contra aquesta malaltia. Per tant, en un futur previsible el taxol seguirà sent un fàrmac quimioterapèutic important, tant per la lluita contra el càncer com també pel seu possible ús en altres patologies. No obstant això, una de les seves principals limitacions en el seu ús és la producció costosa, insuficient i insostenible, que encara no està resolta. Des de la seva aprovació com a fàrmac antineoplàstic, les dificultats per l'obtenció d'elevades quantitats d'aquest, ha causat que la

demanda superés amb escriu la seva oferta, ja que s'obtenia de l'escorça dels teixos, on es trobava en molt baixes concentracions, fet que provocava que s'haguessin de talar enormes quantitats de teixos comportant problemes mediambientals per la seva obtenció. Per aquesta raó, s'opta per la cerca d'estratègies més econòmiques i ecològicament sostenibles per obtenir el taxol. Una de les estratègies desenvolupada encara que no viable comercialment, és la síntesi química. Una altra estratègia, és la semi síntesi, que no obstant, no és la millor opció per produir taxol. Pel que fa al cultiu in vitro de cèl·lules i teixits de *Taxus spp.*, és l'estratègia més sostenible per produir taxol que hi ha actualment. No obstant, la complexitat de la ruta biosintètica, de la qual encara se'n desconeixen alguns gens implicats i la falta de coneixement de la seva regulació, limiten l'establiment d'estratègies de producció.

Fins ara, el que sembla la millor opció per obtenir de forma més sostenible majors concentracions de taxol, encara que presenti certs desavantatges, com els alts costos i que els rendiments de producció siguin inestables, són els cultius cel·lulars optimitzats de *Taxus spp.* Sobretot, s'han estudiat molt a *T. baccata*, *T. chinensis*, *T. media* i també a *T. globosa*, que s'ha descobert recentment que produeix taxol i per tant, encara s'han de desenvolupar més optimitzacions del seu cultiu. L'ús d'elicitors tant biòtics, abiòtics o la combinació d'ambdós, per activar els gens involucrats en la biosíntesis del taxol és una estratègia efectiva per incrementar la seva producció. Elicitors com el MeJA, el SA, entre d'altres, es van utilitzar des d'un inici. No obstant, degut a que la seva eficiència va resultar ser insuficient, es cerquen elicitors més eficients, com la CD. Aquesta, com que forma complexes d'inclusió amb el taxol condueix a una elevada taxa de secreció d'aquest al medi permetent que s'estableixin sistemes continus de producció a nivell de bioreactor, a més de disminuir la toxicitat cel·lular i de prevenir la possible degradació enzimàtica. De totes les estratègies estudiades, la més innovadora i que ha resultat amb un augment significatiu de taxol ha estat la combinació de COR amb les nanopartícules CAL en cultius cel·lulars de *T. media*. Aquesta, sembla ser una estratègia efectiva per una producció ecològica, sostenible i econòmica de paclitaxel, ja que s'obtenen resultats molt similars que quan s'utilitza la CD amb altres elicitors com per exemple amb la COR o el MeJA, però a més, s'obtenen aquests resultats amb menys concentració que de CD. Una altra estratègia amb la qual s'obtenen també nivells elevats de taxol és l'addició de COR i CD en cultius cel·lulars de *T. globosa*, que mostren una elevada taxa de secreció de taxol al medi. Tot i així, encara hi ha alguns aspectes del mecanisme molecular de l'acció dels elicitors i de la seva acció sinèrgica que no es coneixen i per tant, s'ha de seguir investigant com influeixen aquests en la síntesi de taxol. La resta dels elicitors estudiats, com PEG, PFD i els agents osmòtics, tot i que també augmenten la producció de taxol, encara necessiten més estudis sobre el seu ús per obtenir-lo a nivell industrial.

Pel que fa a l'enginyeria metabòlica de *Taxus spp.*, una de les estratègies per augmentar el taxol, és la incorporació del gen *TXS* en cultius cel·lulars de *T. media*, tot i que per incrementar la producció d'aquest, és necessària també la presència d'elicitors. De les estratègies estudiades en cultius cel·lulars transgènics, quan s'aplica conjuntament MeJA i CD s'obté una elevada concentració de taxol, que resulta en una reprogramació important en l'expressió de gens implicats en la biosíntesi del taxol. El mateix s'observa amb l'aplicació conjunta de CD i COR, tot i que mostra major concentració de taxol extracel·lular. Pel que fa als cultius de *hairy roots*, que han estat transformats amb el gen de la *TXS* de *T. baccata*, mostren menys producció i secreció de taxol al medi que els cultius cel·lulars de *Taxus spp.* transgènics. A més, que presenten possiblement major dificultat per escalar-los a nivell industrial. Altres estratègies d'enginyeria metabòlica potents per augmentar la síntesi de taxol, és el bloqueig de vies metabòliques competitives de la síntesi de taxol amb tecnologia antisentit, CRISPR/Cas9 i amb miRNA. No obstant, encara es necessita més investigació per poder-les utilitzar a nivell comercial.

També, s'estudia, la possibilitat de sobreexpressar gens que són limitants per la síntesi del paclitaxel. En un sentit holístic, podria ser possible obtenir cultius cel·lulars que sobreexpressin gens que codifiquen per factors de transcripció de la via metabòlica per activar varis passos biosintètics i així, desenvolupar nous sistemes de producció biotecnològica per la producció de taxol i taxans. Per tant, en cultius cel·lulars, la combinació de l'enginyeria metabòlica amb la tecnologia aplicada en aquest tipus de cultius, pot resultar en major productivitat de taxol a gran escala. Tanmateix, la comprensió insuficient del control de la ruta del taxol, comporta que es necessitin més investigacions per establir aquestes estratègies. Finalment, pel que fa a la producció heteròloga, fins al moment només s'han pogut expressar els primers enzims de la ruta en alguns microorganismes i plantes. Aquests intents de sintetitzar paclitaxel en hostes heteròlegs, demostren que la ruta biosintètica és molt complexa i la comprensió incompleta. Per tant, s'ha de seguir investigant per intentar implementar tota la ruta del taxol en aquests organismes.

7. BIBLIOGRAFIA

- Almagro, L., & Pedreño, M. Á. (2020). Use of cyclodextrins to improve the production of plant bioactive compounds. *Phytochemistry Reviews*, 19(4), 1061–1080. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09704-6>
- Amini, S.-A., Shabani, L., Afghani, L., Jalalpour, Z., & Sharifi-Tehrani, M. (2014). Squalenstatin-induced production of taxol and baccatin in cell suspension culture of yew (*Taxus baccata* L.). *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, 38, 528–536. <https://doi.org/10.3906/biy-1401-47>
- Barrales-Cureño, H. J., Farrera Roa, A., Reyes, C. R., Yamiri, I., Flores, H., Arzate, E. G., & Salinas, S. C. (2016). *Artículo de divulgación Generalidades del fármaco Taxol: una revisión sistemática Taxol generalities: a systematic review* (Vol. 16, Issue 1).
- Barrales-Cureño, H. J., Ramos Valdivia, A. C., & Soto Hernández, M. (2022). Increased Production of Taxoids in Suspension Cultures of *Taxus globosa* after Elicitation. *Future Pharmacology*, 2(1), 45–54. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2010004>
- Changxing, L., Galani, S., Hassan, F., Rashid, Z., Naveed, M., Fang, D., Ashraf, A., Qi, W., Arif, A., Saeed, M., Chishti, A. A., & Jianhua, L. (2020). Biotechnological approaches to the production of plant-derived promising anticancer agents: An update and overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132, 110918. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110918>
- Chen, Y., Zhang, H., Zhang, M., Zhang, W., Ou, Z., Peng, Z., Fu, C., Zhao, C., & Yu, L. (2021). Salicylic Acid-Responsive Factor TcWRKY33 Positively Regulates Taxol Biosynthesis in *Taxus chinensis* in Direct and Indirect Ways. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.697476>
- Cusido, R. M., Onrubia, M., Sabater-Jara, A. B., Moyano, E., Bonfill, M., Goossens, A., Angeles Pedreño, M., & Palazon, J. (2014). A rational approach to improving the biotechnological production of taxanes in plant cell cultures of *Taxus* spp. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1157–1167. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.002>
- Escrich, A., Almagro, L., Moyano, E., Cusido, R. M., Bonfill, M., Hosseini, B., & Palazon, J. (2021). Improved biotechnological production of paclitaxel in *Taxus media* cell cultures by the combined action of coronatine and calix[8]arenes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 163, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.047>
- Gallego-Jara, J., Lozano-Terol, G., Sola-Martínez, R. A., Cánovas-Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2020). A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. *Molecules*, 25(24), 5986. <https://doi.org/10.3390/molecules25245986>
- Hasan, Md., Bashir, T., & Bae, H. (2017). Use of Ultrasonication Technology for the Increased Production of Plant Secondary Metabolites. *Molecules*, 22(7), 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules22071046>
- Howat, S., Park, B., Oh, I. S., Jin, Y.-W., Lee, E.-K., & Loake, G. J. (2014). Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *New Biotechnology*, 31(3), 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.010>
- Liu, W. C., Gong, T., & Zhu, P. (2016). Advances in exploring alternative Taxol sources. *RSC Advances*, 6(54), 48800–48809. <https://doi.org/10.1039/C6RA06640B>
- Matsuura, H. N., Malik, S., de Costa, F., Yousefzadi, M., Mirjalili, M. H., Arroo, R., Bhambra, A. S., Strnad, M., Bonfill, M., & Fett-Neto, A. G. (2018a). Specialized Plant Metabolism Characteristics and Impact on Target Molecule Biotechnological Production. In *Molecular Biotechnology* (Vol. 60, Issue 2, pp. 169–183). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0056-1>
- Matsuura, H. N., Malik, S., de Costa, F., Yousefzadi, M., Mirjalili, M. H., Arroo, R., Bhambra, A. S., Strnad, M., Bonfill, M., & Fett-Neto, A. G. (2018b). Specialized Plant Metabolism Characteristics and Impact on Target Molecule Biotechnological Production. *Molecular Biotechnology*, 60(2), 169–183. <https://doi.org/10.1007/s12033-017-0056-1>
- Mutanda, I., Li, J., Xu, F., & Wang, Y. (2021). Recent Advances in Metabolic Engineering, Protein Engineering, and Transcriptome-Guided Insights Toward Synthetic Production of Taxol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.632269>
- Osuna, L., Tapia, N., Cusidó, R., Palazón, J., Bonfill, M., Zamilpa, A., López-Upton, J., & Cruz-Sosa, F. (2015). Taxane production induced by methyl jasmonate in free and immobilized cell cultures of Mexican yew (*Taxus globosa* Schltdl). *Acta Physiologicae Plantarum*, 37(10), 199. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1947-z>
- Ramirez-Estrada, K., Osuna, L., Moyano, E., Bonfill, M., Tapia, N., Cusido, R. M., & Palazon, J. (2015). Changes in gene transcription and taxane production in elicited cell cultures of *Taxus media* and *Taxus globosa*. *Phytochemistry*, 117, 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.013>

- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R., & Palazon, J. (2016). Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*, 21(2), 182. <https://doi.org/10.3390/molecules21020182>
- Sabater-Jara, A.-B., Onrubia, M., Moyano, E., Bonfill, M., Palazón, J., Pedreño, M. A., & Cusidó, R. M. (2014). Synergistic effect of cyclodextrins and methyl jasmonate on taxane production in *Taxus x media* cell cultures. *Plant Biotechnology Journal*, 12(8), 1075–1084. <https://doi.org/10.1111/pbi.12214>
- Sabzehzari, M., Zeinali, M., & Naghavi, M. R. (2020). Alternative sources and metabolic engineering of Taxol: Advances and future perspectives. In *Biotechnology Advances* (Vol. 43). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107569>
- Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A., & Mirjalili, M. H. (2018). The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.09.013>
- Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A., & Mirjalili, M. H. (2019). Improved effects of polyethylene glycol on the growth, antioxidative enzymes activity and taxanes production in a *Taxus baccata* L. callus culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137(2), 319–328. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01573-y>
- Sarmadi, M., Karimi, N., Palazón, J., Ghassempour, A., & Mirjalili, M. H. (2020). Physiological, biochemical, and metabolic responses of a *Taxus baccata* L. callus culture under drought stress. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 56(5), 703–717. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10128-2>
- Sykłowska-Baranek, K., Grech-Baran, M., Naliwajski, M. R., Bonfill, M., & Pietrosiuk, A. (2015). Paclitaxel production and PAL activity in hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* carrying a taxadiene synthase transgene elicited with nitric oxide and methyl jasmonate. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(10), 218. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1949-x>
- Sykłowska-Baranek, K., Pilarek, M., Bonfill, M., Kafel, K., & Pietrosiuk, A. (2015). Perfluorodecalin-supported system enhances taxane production in hairy root cultures of *Taxus x media* var. *Hicksii* carrying a taxadiene synthase transgene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 1051–1059. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0659-1>
- Sykłowska-Baranek, K., Rymaszewski, W., Gaweł, M., Rokicki, P., Pilarek, M., Grech-Baran, M., Hennig, J., & Pietrosiuk, A. (2019). Comparison of elicitor-based effects on metabolic responses of *Taxus x media* hairy roots in perfluorodecalin-supported two-phase culture system. *Plant Cell Reports*, 38(1), 85–99. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2351-0>
- Vidal-Limon, H. R., Almagro, L., Moyano, E., Palazon, J., Pedreño, M. A., & Cusido, R. M. (2018). Perfluorodecalins and Hexenol as Inducers of Secondary Metabolism in *Taxus media* and *Vitis vinifera* Cell Cultures. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00335>
- Vidal-Limon, H. R., Sanchez-Muñoz, R., Khojasteh, A., Moyano, E., Cusido, R. M., & Palazon, J. (2018). *Taxus Cell Cultures: An Effective Biotechnological Tool to Enhance and Gain New Biosynthetic Insights into Taxane Production* (pp. 295–316). https://doi.org/10.1007/978-3-319-54600-1_5
- Wang, S., Li, C., Wang, H., Zhong, X., Zhao, J., Tong, Y., & Zhou, Y. (2016). Effect of elicitors, precursors and metabolic inhibitors on paclitaxel production by *Taxus cuspidata* cell culture. *Journal of Forestry Research*, 27(6), 1257–1263. <https://doi.org/10.1007/s11676-016-0217-2>
- Wang, T., Li, L., Zhuang, W., Zhang, F., Shu, X., Wang, N., & Wang, Z. (2021). Recent Research Progress in Taxol Biosynthetic Pathway and Acylation Reactions Mediated by *Taxus* Acyltransferases. *Molecules*, 26(10), 2855. <https://doi.org/10.3390/molecules26102855>
- Yamamoto, S., Koga, H., Hayashi, S., & Shioya, S. (2014). Enhancement of Taxane Production by the Combination of in situ Extraction with Lauryl Alcohol and Elicitation by Methyl Jasmonate in a Suspension Callus Culture. *Solvent Extraction Research and Development, Japan*, 21(2), 217–222. <https://doi.org/10.15261/serdj.21.217>
- Yamamoto, S., Taura, K., Hayashi, S., & Shioya, S. (2014). Effect of Lauryl Alcohol on Production of Taxanes in a Suspension Callus Culture. *Solvent Extraction Research and Development, Japan*, 21(1), 95–101. <https://doi.org/10.15261/serdj.21.95>
- Yang, Y.-H., Mao, J.-W., & Tan, X.-L. (2020). Research progress on the source, production, and anti-cancer mechanisms of paclitaxel. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 18(12), 890–897. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(20\)60032-2](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(20)60032-2)
- Zhao, C., Song, G., Fu, C., Dong, Y., Xu, H., Zhang, H., & Yu, L. J. (2016). A systematic approach to expound the variations in taxane production under different dissolved oxygen conditions in *Taxus chinensis* cells. *Plant Cell Reports*, 35(3), 541–559. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1902-x>