

MYKES

Boletín do Grupo Micológico Galego
“Luis Freire”

Volume 12
2009

PAPEL DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS NA OBTENCIÓN DE TAXANOS

por
N.F.ANDRÉS-RODRÍGUEZ

ANDRÉS-RODRÍGUEZ, N.F. 2009. Papel dos fungos endofíticos na obtención de taxanos. *Mykes* 12: 78-85.

RESUMO:

Paclitaxel é un dos antitumorais máis empregados na terapia actual de diversos tipos de cancro. A súa obtención do cortizo do *Taxus brevifolia* puxo en perigo de extinción á especie. A extracción a partir das acículas do *T. baccata* garantiu o subministro aínda que con menor rendemento. Nos derradeiros anos invéstíganse diversas especies de fungos endofíticos como fonte de paclitaxel mediante técnicas de enxeñería xenética.

Palabras clave: Taxol, paclitaxel, cancro, farmacoterapia, fungos endofíticos.

ANDRÉS-RODRÍGUEZ, N.F. 2009. Role of endophytic fungi in the synthesis of taxanes. *Mykes* 12: 78-85.

SUMMARY:

Paclitaxel is one of the most commonly used in current antitumoral therapy of various types of cancer. Obtaining from the crust of *Taxus brevifolia* placed the species in danger of extinction. Removal of the needles of *T. baccata* guaranteed supply but with reduced performance. In recent years are in study various species of endophytic fungi as a source of paclitaxel using genetic engineering techniques.

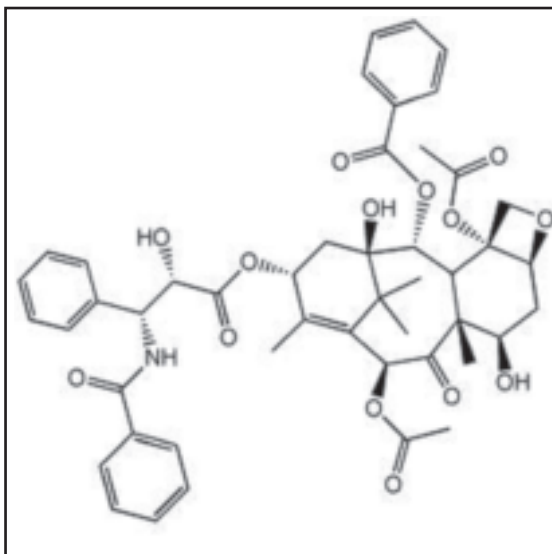
Key words: Taxol, paclitaxel, cancer, pharmacotherapy, endophytic fungi.

INTRODUCCIÓN

Paclitaxel (Taxol®, Paxene®, Paclitaxel EFG) é un antitumoral amplamente utilizado na terapia oncolóxica de hoxe en día. Dende o punto de vista estrutural trátase dun diterpeno cíclico derivado do núcleo do taxano. Posúe

¹R/ Cánovas del Castillo I, Vigo E-36202-Pontevedra. e-mail: fandresr@redfarma.org. Membro do Grupo Micolóxico Galego Luís Freire.

un anel oxetano de catro membros e unha cadea amídica, a cal, ó modificarse, dá lugar ó docetaxel, outro taxano tamén activo como antitumoral (Taxotere®) (RABIÑA RUBIRA, 2009).



Paclitaxel presenta unha baixa solubilidade en auga, polo que debe ser administrado disolto en aceite de castor polietoxilado e etanol, o que orixina serios efectos adversos. Recentemente aprobouse unha nova presentación de paclitaxel (Abraxane®). A encapsulación en nanopartículas de albúmina libera altas concentracións do principio activo e diminúe os efectos adversos orixinados no excipiente en especial a neutropenia (VILLAESCUSA CASTILLO, 2006).

Foi achado a comezo dos anos 60 do pasado século nos extractos do cortizo do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) durante un programa de investigación conxunto de axentes antitumorais do Instituto Nacional do Cancro e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, no que se cribaron máis de 100.000 especies vexetais. Ata entón os antitumorais máis utilizados procedían tamén doutras plantas medicinais, a vinca (*Vinca minor*) e o podofilino (*Podophyllum peltatum*) (RABIÑA RUBIRA, 2009).

USO NA FARMACOTERAPIA DO CANCRO

Os taxanos actúan bloqueando a división celular ó impedir a despolimerización da tubulina dos microtúbulos que se atopan nos fusos mitóticos, de xeito que se inactiva a reorganización normal da rede microtubular, esencial para o proceso da mitose e outros procesos celulares. Este mecanismo de acción baseado na actividade citotóxica, ó non ser absolutamente específico, e o mesmo tempo o causante da súa toxicidades nas células sans do organismo.

Paclitaxel está indicado na terapia farmacolóxica de diversos tipos de cancro. En cancro de ovario, como terapia de primeira liña, como coadjuvante de cisplatino, ou como terapia de segunda liña despois do fracaso de

tratamento con cisplatino. É tratamento adxuvante en cancro de mama con ganglios positivos despois do tratamento con antraciclina e ciclofosfamida e como alternativa a elas. No tratamento de primeira liña do cancro de mama soe combinarse con doxorubicina ou trastuzumab. Se usa no cancro de pulmón non microcítico avanzado en combinación con cisplatino en pacientes que non son candidatos á cirurxía ou a radioterapia. Está indicado tamén no sarcoma de Kaposi vinculado ó SIDA, aínda que a evidencia sinala que a súa eficacia é limitada (AGENCIA ESPAÑOLA DEL MEDICAMENTO Y PRODUCTOS SANITARIOS, 2006).

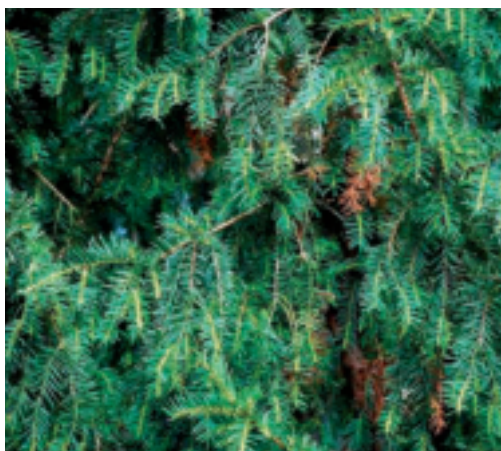
Para tentar paliar os efectos secundarios do tratamento os pacientes deberán ser premedicados con corticosteroides, antihistamínicos e antagonistas- H_2 .

Fora do uso no tratamento do cancro tamén se emprega na prevención da reestenose nos casos de estenose recorrente, tras implante dun *stent* nunha arteria coronaria. O paclitaxel no *stent* tratado limita o crecemento das células no tecido cicatrizal.

OBTENCIÓN E SÍNTESE INDUSTRIAL DO PACLITAXEL

Orixinalmente Paclitaxel obtívose do extracto do cortizo de *Taxus brevifolia* (WANI *et al.*, 1971), no que se atopa nunha concentración moi baixa (0,5 g de paclitaxel obtidos a partir de 12 Kg de talo e cortizo seco), o que dificulta a súa extracción. De xeito que dun teixo de 13 metros de altura e 200 anos de idade so se obtería medio gramo de paclitaxel. O tratamento completo dun paciente oncolóxico require máis de 2 gramos de paclitaxel. Nas condicións máis favorables para a obtención de 1 Kg de paclitaxel serían necesarias sete toneladas de cortizo de teixo, o que levaría á morte das árbores e á extinción da especie.

A primeira alternativa que se tentou foi a diversificación das fontes arbóreas de obtención de paclitaxel. Illouse tamén doutras especies de *Taxus* (*T. baccata*, *T. cuspidata*, *T. canadiensis*, *T. wallichiana*, *T. yunnanensis*, *T. x media*, etc.), único xénero onde se atopa, pero os rendementos foron sempre moi baixos. A síntese completa do



Taxus brevifolia

paclitaxel é moi complexa, polo que as investigacións centráronse na obtención de precursores que permitira unha semisíntese máis doada.

O profesor da Universidade de Florida Robert A. Holton patentou un proceso de semisíntese industrial de paclitaxel a partires da 10-desacetilbacatina, precursor non citotóxico, illado por Potier e colaboradores (SÉNILH *et al.*, 1984) das agullas do teixo europeo (*Taxus baccata*). As acículas desta árbore pódense colleitar en grandes cantidades pois rexenéranse de seguida. Aínda que Potier desenrolou un método de semisíntese partindo do mesmo precursor, o laboratorio Bristol-Myers Squibb decantouse polo de Holton para a obtención do paclitaxel co que prepararía o seu medicamento (Taxol®).

As investigacións para incrementar a produtividade das fontes vexetais de paclitaxel continúan na actualidade. O teixo mexicano (*Taxus globosa*) foi estudado por un grupo de investigadores da Universidade de Toluca (México) como posible fonte para a extracción de paclitaxel e seus análogos a partires do cortizo, agullas e talo (SOTO *et al.*, 2000). O contido en taxanos do extracto purificado se analizou mediante cromatografía en capa fina (TLC) e cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), e se avaliou a súa capacidade estabilizadora dos microtúbulos en comparación cun patrón de paclitaxel. Como se reflicte na táboa adxunta, o contido foi maior nas agullas e a actividade no cortizo.

Contido de paclitaxel		Actividade relativa
Fración	% en peso seco	Paclitaxel= 1,0
Cortizo	0,0085±0,000235	1,09
Agullas	0,0130±0,00122	0,31
Talo	0,0064±0,00068	0,52

CORREA *et al.* (2006) cuantificaron os resultados do cultivo de segmentos de talo e agullas de *T. baccata* en medio TM5, para produción de callos, nos que avaliaron a concentración de taxanos, resultando a de paclitaxel entre 1,90-8,75 mg/L, e a de baccatin III entre 4,55-18,90 mg/L. O Grupo de Investigación de Biotecnoloxía Vexetal da Unidade de Fisioloxía Vexetal da Facultade de Farmacia de Barcelona investiga melloras na produción de paclitaxel, baccatin III e outros taxanos en cultivos celulares de callos de *Taxus baccata* mediante enxeñería metabólica (EXPÓSITO *et al.*, 2009).

MICROORGANISMOS FONTE DE PACLITAXEL

Os organismos endófitos (fungos, bacterias, protistas) invaden durante parte ou a totalidade do seu ciclo vital as estruturas vexetais vivas, nos espazos

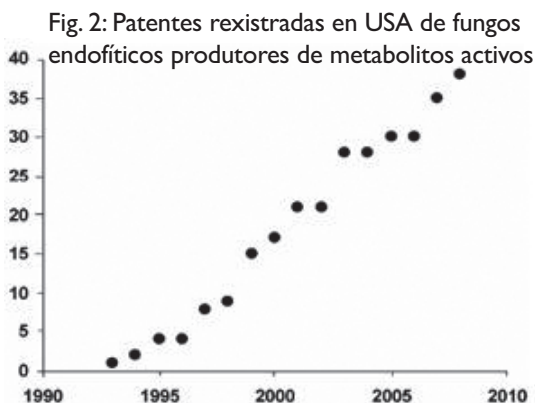
intercelulares dos tecidos vexetais, causando infeccións asimptomáticas, establecendo có hóspe de relacións complexas de carácter simbiótico, que en algúns casos axuda ó hóspe de a soportar situacións de estrés biótico e abiótico. Producen sustancias bioactivas envolvidas na súa relación endófito-hóspe de, moitas delas as mesmas producidas polo árbore.

A pesares do éxito da semisíntese de paclitaxel a partires de precursores de doada obtención, varias liñas de investigación de interese tentan obtelo de cultivos biolóxicos de fungos endofíticos que viven asociados a árbores do xénero *Taxus* e outros.

Dende os anos noventa do pasado século veñen estudándose diversas especies de fungos endofíticos de cara ó cribado e síntese de novos medicamentos con actividade antitumoral, e tentando achar novos métodos para outros xa coñecidos, que puideran servir de alternativa á obtención a partires de extractos dos hóspedes, que estaban a poñer en perigo moitas especies en delicada situación de sobrevivencia. A proba do interese da comunidade científica no eido dos fungos endofíticos produtores de metabolitos con actividade farmacolóxica ou precursores biosintéticos deles amósase na figura na que se reflicte o rápido incremento do número de patentes rexistradas nos EEUU nos derradeiros anos do século XX e comezos do XXI (PRITI *et al.*, 2009).

Stierle e o seu grupo de colaboradores do Departamento de Patoloxía Vexetal da Universidade de Montana (EEUU) illaron e identificaron un novo *Ascomycetes* endofítico da flema (interior do cortizo) no *T. brevifolia* (STROBEL *et al.*, 1993). Estudaron microorganismos atopados en exemplares de teixo do Pacífico procedentes de 20 localidades do norte do estado de Montana. Dos 200 taxones cribados so *Taxomyces andreanae* amosou capacidade de producir paclitaxel.

O cultivo do fungo se fixo por transferencia de hifas a partires do medio agar no que as pezas de cortizo foran cultivadas. Se fixeron varias transferencias en diversos medios para eliminar posibles restos das sustancias procedentes das árbores. Por último transferíronse ó medio definitivo de cultivo (S-7) nas condicións óptimas que



resultaron ser de 25°C e un ratio superficie/volume do medio de 1,3 cm²/ml. Tras 21 días se filtrou e extraio do medio coa axuda de solventes orgánicos (diclorometano e cloroformo/metanol). A cromatografía en capa fina (TLC) do extracto orgánico amosou a presenza de paclitaxel e outros taxanos, aínda que cun pequeno rendemento (24-50 ng/L) (STIERLE *et al.*, 1993).

No ano 1996 outro grupo de investigadores da Universidade de Montana (EEUU), do que tamén formaba parte Gary Strobel, investigou o contido en fungos endofíticos doutra especie de teixo, o *Taxus wallichiana*, procedente da rexión do Himalaya. Atoparon 33 especies de fungos endofíticos, entre eles *Pestalotiopsis microspora*, que illaron, cultivaron e purificaron. Demostraron a produción de paclitaxel que extraeron do cultivo e identificaron espectroscopicamente, e amosaron que a súa actividade antimitótica fronte a un test con 26 liñas de células tumorais era equivalente á do paclitaxel de referencia. A cantidade total de paclitaxel producido foi de 60-70 µg/L. A produción de paclitaxel era máxima ás 2-3 semanas de incubación e se reducía rapidamente despois de 5 semanas (STROBEL *et al.*, 1996).

En anos máis recentes continúan os estudos con outros fungos endofitos. Un grupo de investigadores do Laboratorio de Agrobioloxía da Universidade de Shanghai informou en 2006 do illamento dun novo fungo, provisionalmente denominado BT2 (*Ozonium sp.*), extraído do interior do cortizo de exemplares de *Taxus chinensis* var. *mairei*, procedente da montaña JinYun (China). De 21 fungos illados so *Ozonium sp.* se amosou como produtor de paclitaxel e baccatin III, comprobados mediante espectrometría de masas e HPLC. Os rendementos estiveron entre 4-7 µg para paclitaxel e 12-18 µg para baccatin III por litro de medio de cultivo (GUO *et al.*, 2006).

GANGADUVI *et MUTHUMARY* (2008) investigaron a produción de paclitaxel por *Bartalinia robillardoides* Tassi, illado de *Aegle marmelos* Correa ex Roxb., cultivado en medio líquido MID. Os resultados foron significativos, lográndose un rendemento de 187,6 µg por litro de cultivo, o que suxire que pode servir como potencial fonte de material para a obtención por enxeñería xenética de paclitaxel. O paclitaxel obtido amosou a súa potencial actividade citotóxica *in vitro* fronte a diversos tipos de células de cancro humanas.

No ano 2009 investigadores da Escola de Ciencias e Enxeñería Biolóxicas da Universidade de Shaanxi (China) atoparon no cortizo do *Taxus chinensis*, procedente das montañas Quinba (China), 290 fungos endofíticos dos xéneros *Fusarium*, *Massaria*, *Penicillium*, *Pezicula*, e outros non identificados (DENG *et al.*, 2009). Deles aillaron un que chamaron Tax-3 e identificaron como *Fusarium solani*. A extracción do *F. solani* se fixo en medio PDA (patata-dextrosa-agar) durante 2-15 días a 28°C, e posteriormente se pasou a diversos medios

líquidos para a avaliación da súa produción de paclitaxel. A taxa de paclitaxel obtido estivo, segundo o medio, entre 67,9-163,35 µg por litro de cultivo. Aínda que non supera a obtida por GANGADUVI *et MUTHUMARY* (2008), é maior que as recollidas na revisión de ZHOU *et al.* (2001) que se sitúa entre 24 ng/L e 125,7 µg/L. O mesmo taxón foi illado por investigadores do Instituto Indio da Ciencia de Bangalore (India) doutro teixo, *Taxus celebica*, aínda que con menor produción de taxanos (1,6 g/L de medio) (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2008).

As favorables expectativas que espertou nos anos finais do derradeiro século a obtención de paclitaxel e outras moléculas con actividade antitumoral a partires de cultivos biolóxicos de fungos endófitos, levou a descuberta de abondosas especies de fungos potenciais fontes de biosíntese desas sustancias e metabolitos precursores. Sen embargo, hoxe en día non se atopan publicadas referencias á súa aplicación industrial. O problema parece estar no rendemento moi baixo e inconstante do proceso de fermentación fúnxica para a produción de taxanos, taxa que varía para cada fungo, e que se relaciona coas condicións ecolóxicas e a especificidade da relación fungo-árbore. Aínda hoxe non é ben coñecido o proceso polo que o fungo xera os mesmos metabolitos que o hóspede, créese que pode estar relacionado con mecanismos de recombinación xenética durante el proceso evolutivo

Sen embargo, os resultados apuntan a que as rutas biosintéticas para a produción de taxanos por enxeñería xenética que incrementen os ratios de produción poden supoñer o futuro da obtención dos medicamentos antitumorais e outros produtos farmacoloxicamente activos.

BIBLIOGRAFÍA

- AGENCIA ESPAÑOLA DEL MEDICAMENTO Y PRODUCTOS SANITARIOS. 2006. Ficha técnica de Taxol®. [Acceso 18/3/2010]. Disponible en: <https://sinaem4.agedmed.es/consaem/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=60210&formato=pdf&formulario=FI-CHAS>
- CHAKRAVARTHI, B.V.S.K., DAS, P., SURENDRANATH, K., KARANDE, A.A. *et* JAYABASKARAN, C. 2008. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *J. Biosci.* 33: 259-267.
- CORREA, Y.M., NIÑO, J. *et* MOSQUERA, O.M. 2006. Cuantificación de Taxol y Baccatin III en callos de *Taxus baccata* por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). *Scientia et Technica* 12(32): 431-435.
- DENG, B.W., LIU, K.H., CHEN, W.Q., DING, X.W. *et* XIE, X. C. 2009. *Fusarium solani*; Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 139-143.
- EXÓSITO, O., BONFILL, M., ONRUBIA, M., JANÉ, A., MOYANO, E., CUSIDÓ, R.M., PALAZÓN, J. *et* PIÑOL, M.T. 2009. Effect of taxol feeding on taxol and related taxane production in

- Taxus baccata* suspension cultures. *New Biotechnol.* 25(4): 252-259.
- GANGADEVI, V. et MUTHUMARY, J. 2008. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 717-724.
- GUO, B.H., WANG, Y.C., ZHOU, X.W., HU, K., TAN, F., MIAO, Z.Q. et TANG, K.X. 2006. An endophytic Taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Afr. J. Biotechnol.* 5(10): 875-877.
- PRITI, V., RAMESHA, B. T., SINGH, S., RAVIKANTH, G., GANESHAIAH, K. N., SURYANARAYANAN T. S. et SHAANKER R. U. 2009. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? *Current Science* 97(4): 477-478.
- RAVIÑA RUBIRA, E. 2008. *Medicamentos. Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de los fármacos. Vol. I.* Universidad de Santiago de Compostela: 253-261.
- SÉNILH, V., BLECHERT, S., COLIN, M., GUÉNARD, D., PICOT, F., POTIER, P. et VARENNE, P. 1984. Mise en évidence de nouveaux analogues du taxol extraits de *Taxus baccata*. *J. Nat. Prod.* 47(1): 131-137.
- SOTO, M., SANJURJO, M., GONZÁLEZ GIRAL, M. T., CRUZ, D. et GIRAL, F. 2000. El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. *Ciencia ergo Sum* 7(3): 277-279.
- STIERLE, A., STROBEL, G. et STIERLE, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260(5105): 214-216.
- STROBEL, G., STIERLE, A., STIERLE, D. et HESS W. M. 1993. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*). *Mycotaxon* 47: 71-80.
- STROBEL, G., YANG, X., SEARS, J., KRAMER, R., SIDHU, R. S. et HESS, W. M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiol.* 142: 435-440.
- VILLAESCUSA CASTILLO, L., 2006. Ejemplos de la Naturaleza: el Taxol. *Actualidad Farmacol. Terapéutica.* 4(1): 35-39.
- WANI, M. C., TAYLOR, H. L., WALL, M. E., COGGON, P. et MCPHAIL, A. T. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Amer. Chem. Soc.* 93: 2325-2327.
- ZHOU, D. P., PING, W. X., SUN, J. Q., ZHOU, X. H., LIU, X. L., YANG, D. Z., ZHANG, J. P. et ZHENG, X. Q. 2001. Isolation of taxol-producing fungi. *J. Microbiol.* 21: 18-20.