

Células vegetales:

biorreactores para diseñar y producir biomoléculas y remover compuestos tóxicos

Graciano Calva Calva¹, Josefina Pérez Vargas², Felipe Palma Cruz³

Después de casi 40 años de investigación en el área biotecnológica para usar cultivos de células vegetales en la producción de compuestos de importancia biológica, las plantas aún siguen siendo la principal fuente de la mayoría de los productos naturales^a usados en la industria farmacéutica, cosmetológica y alimentaria. La mayoría de los investigadores que han trabajado en esta área coinciden en que esa falta de éxito es debida a que se conoce muy poco acerca de las rutas de biosíntesis y degradación de estos compuestos. No obstante, los considerables adelantos de última década en el área de la

Biotecnología Vegetal Molecular, ha dado la oportunidad de que las plantas puedan concebirse como verdaderos biorreactores para la producción biotecnológica de metabolitos secundarios o productos naturales y de otras biomoléculas como anticuerpos,^{1,2} antígenos^{3,4} y proteínas^{5,6} así como para la remoción de xenobióticos; compuestos tóxicos para el medio ambiente.⁷ Este trabajo hace una remembranza de cómo la manipulación genética y molecular del metabolismo secundario ha dado lugar a esas oportunidades y espontáneamente a nuevas estrategias experimentales y procesos biotecnológicos para la obtención de productos naturales y transgénicos.

Acerca de los autores...

¹ CINVESTAV-IPN, Depto. Biotecnología y Bioingeniería, Ingeniería Metabólica
gcalva@cinvestav.mx

² Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, División de Ing. Química y Bioquímica, Biotecnología Ambiental, djperezvargas@yahoo.com.mx

³ Instituto Tecnológico de Oaxaca

Referencias...

- a** "Productos naturales" se refiere a aquellos compuestos de origen natural que son únicos de una especie de organismo o a un pequeño número de especies estrechamente relacionadas (J. Mann, 1993. Secondary metabolism.).
- b** Xenobióticos: compuestos orgánicos no naturales y tóxicos para los seres vivos. (J. M. Lackie and J.A.T. Dow., 2000. The dictionary of cell and molecular biology

Obtención de productos naturales en biorreactores

Las plantas han sido la principal fuente de alimentos y de metabolitos secundarios o productos naturales desde tiempos prehistóricos.⁸ Este tipo de compuestos, que incluye fármacos, insecticidas, saborizantes, aromas y colorantes, se utilizan comúnmente como materias primas o principios activos en la industria química, farmacéutica, agrícola y alimentaria (Tabla 1). Sin embargo, debido a los problemas ambientales provocados por el hombre y a la sobreexplotación de las fuentes naturales, muchas especies vegetales están en peligro de extinción o han desaparecido ya. Es comprensible entonces, que se esté realizando un gran esfuerzo para obtener ese tipo de compuestos usando técnicas alternativas a las naturales, como el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales en biorreactores que en México se han investigado ampliamente desde los últimos 35 años. Estas técnicas, que inicialmente incluían cultivos sumergidos de células en suspensión, células inmovilizadas, brotes, embriones y raíces,^{9,10,11} posteriormente abarcaron cultivos de células y raíces transformadas y la obtención de plantas transgénicas.^{2,5}

El potencial del cultivo de células, tejidos u órganos vegetales en biorreactores, de manera similar a los procesos de fermentación con microorganismos, para la producción de metabolitos secundarios o productos naturales, fue demostrado plenamente por Zenk et al., en 1976. Zenk logró establecer cultivos de células en suspensión de *Catharanthus roseus* capaces de producir serpentina y ajmalicina, dos alcaloides del indol característicos de esta planta.⁹ Algunas de las ventajas de los cultivos de células vegetales con respecto a las técnicas agrícolas tradicionales que han sido enumeradas por diversos autores^{10,11} son: 1) independencia de las variaciones de factores climáticos, 2) sistemas de producción definidos y constantes, 3) consistencia en los ren-

Tabla 1.
Productos naturales e industria de aplicación

Industria	Producto	Planta	Aplicación
Química	Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Síntesis de anticonceptivos
	Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Precursor de antraquinonas
	Solasodina	<i>Solanum chrysotrichum</i>	Síntesis de esteroides
Farmacéutica	Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
	Quinina	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Antipalúdico
	Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico
	Escopolamina	<i>Datura stramonium</i>	Antihipertensivo
	Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	Anticancerígeno
	Trigonelina	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Anticancerígeno
	Alimentaria	Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
Ginsenosido		<i>Panax ginseng</i>	Saborizante
Capsaicina		<i>Capsicum spp.</i>	Saborizante
Agrícola	Capsaicina	<i>Capsicum spp.</i>	Insecticida

dimientos y calidad del producto, 4) mínimas necesidades de espacio para el desarrollo de la producción, 5) población celular uniforme y facilidad de extracción del producto, 6) independencia de aspectos políticos. No obstante esas ventajas, después de más de 35 años de investigación, sólo cuatro procesos se han podido establecer de manera comercial: Shikonina, de *Lithospermum erythrorhizon* por la compañía Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.,¹³ Gingenósido de *Panax ginseng* y Purpurina de *Rubia akane* por Nitto Denko Corp,¹⁰ y Taxol de *Taxos cuspidata* por Phyton Inc.¹⁴ en asociación con Bristol-Myers Squibb Co. Esto se ha debido principalmente a la baja velocidad de crecimiento de los cultivos de células y tejidos vegetales en comparación con los de microorganismos, la baja productividad volumétrica, bajos rendimientos del producto, altos costos de proceso, la inestabilidad del producto en los cultivos y, principalmente, al pobre conocimiento del metabolismo secundario a nivel de intermediarios metabólicos, su enzimas y de su regulación metabólica. El reconocimiento de estos problemas desde finales de la década de los ochenta,¹² originó que desde ese entonces las investigaciones sobre la producción de metabolitos secundarios se dirigieran hacia la aplicación de diversas estrategias para incrementar la productividad de estos compuestos en los cultivos (Tabla 2). La aplicación de esas estrategias, en especial la genética y la biología molecular en combinación con la bioquímica para estudiar el metabolismo secundario y su regulación, condujo las investigaciones a desarrollar nuevas estrategias experimentales que han culminado en la aparición de áreas como la Ingeniería Metabólica y la Agricultura Molecular (molecular farming).

Ingeniería metabólica

La ingeniería metabólica se refiere a la aplicación de la bioquímica, genética y biología molecular para manipular y estudiar las rutas metabólicas endógenas de un organismo, tiene como objetivo generar cultivos celulares u organismos transgénicos en los que el perfil de los productos naturales característicos de esa especie se vea incrementado o modificado a fin de que adquieran características adecuadas para establecer procesos comercialmente viables.^{15,16} En el caso de productos naturales, el objetivo principal en la mayoría de los casos ha sido el incremento en la producción o velocidad de biosíntesis o la reducción del flujo metabólico hacia la formación de productos metabólicamente colaterales. Así, la aplicación de la ingeniería metabólica en plantas ha permitido obtener organismos que sobreacumulan aceites comestibles e industriales,¹⁷ ligninas¹⁸ y almidones¹⁹ de composición constante y controlada, carotenoides y vitaminas A y E,²⁰ metabolitos secundarios como alcaloides del tropano,²¹ flavonoides y antocianinas.²²

Ingeniería metabólica y Agricultura molecular

Pero la manipulación de las rutas metabólicas de las plantas ha ido más lejos: ha permitido la introducción de material genético proveniente de otras plantas, e inclusive de microorganismos o animales, para proveer a la planta receptora con funciones y habilidades nuevas, como la producción de nuevos compuestos, asimilación de nuevos sustratos y degradación de xenobióticos.²² Esto último está permitien-

Tabla 2.

Estrategias para mejorar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales

Sistemas de Cultivo:
Cultivos de callos
Cultivos de células
Cultivos de brotes
Cultivos de raíces
Cultivos de dos fases
Condiciones de Cultivo:
Optimización del medio de cultivo
Optimización de parámetros nutricionales y fisicoquímicos
Permeabilización celular
Adición de potenciadores (elicitors)
Adición de precursores e intermediarios biosintéticos
Extracción continua del producto
Genética y Biología Molecular Vegetal:
Sobreexpresión de enzimas limitantes de la biosíntesis
Creación de nuevas ramas en las redes metabólicas existentes
Canalización del flux metabólico hacia el producto de interés
Generación de mutantes desreguladas con respecto al producto de interés
Plantas transgénicas sin las ramificaciones de la ruta biosintética principal

La meta de la biorremediación es remover contaminantes orgánicos e inorgánicos a concentraciones indetectables o por debajo de los límites establecidos como seguros o aceptables por las agencias o instituciones reguladoras

do estudiar y entender los mecanismos por los cuales las plantas participan en procesos de remoción de contaminantes del medio ambiente, proceso tecnológico de biorremediación denominado fitorremediación.^{16,23,24}

La meta de la biorremediación es remover contaminantes orgánicos e inorgánicos a concentraciones indetectables o por debajo de los límites establecidos como seguros o aceptables por las agencias o instituciones reguladoras como la EPA (Environmental Protection Agency, USA). La biorremediación se ha usado para la destrucción de contaminantes orgánicos del suelo, aguas subterráneas, lodos, sistemas de desechos industriales y gases. El espectro de compuestos susceptibles de ser degradados biológicamente es muy amplio, sin embargo, debido a la proliferación, su amenaza a la salud y ecología, y a su proclividad para ser atacados por una amplia gama de microorganismos, la mayoría de los estudios se han enfocado al petróleo y sus derivados, gasolina y sus constituyentes, hidrocarburos policíclicos aromáticos, alifáticos clorados como el tricloroetileno y tetracloroetileno, y los hidrocarburos aromáticos clorados. A diferencia de los compuestos anteriores, los metales no son degradados, pero en los procesos de biorremediación éstos pueden modificarse para que sean menos tóxicos a los microorganismos y a la vegetación.

Los procedimientos usados para la remoción de contaminantes generalmente son caros, siendo los biológicos los más económicos. Por ejemplo, algunos costos típicos en dólares por tonelada de suelo son: adición de microorganismos a la tierra (*land farming*), de 39 a 88; composteo, de 44 a 110; apilamiento de suelo, de 99 a 110; tratamiento de fangos, de 88 a 165.²⁵

Las tecnologías que involucran el uso de plantas superiores para la remoción de contaminantes de suelos y aguas, se denominan fitorremediación. Ésta incluye procesos que involucran la toma de contaminantes por la planta o la

biodegradación por microorganismos que colonizan la raíz o el suelo inmediatamente cerca de la raíz. La porción de suelo íntimamente asociada con las raíces de plantas en crecimiento es denominada rizosfera, que incluye la inmediata superficie de las raíces que está extensivamente colonizada por microorganismos, zona llamada rizoplano. El término rizosfera abarca la superficie de las raíces y el suelo adyacente. El factor clave que distingue los límites de la rizosfera, es la presencia de compuestos de bajo peso molecular excretados por las raíces. Estos compuestos sirven de fuente de carbono para muchos de los microorganismos de la rizosfera, sin embargo para los que se encuentran lejos de ella, la fuente de carbono generalmente son los compuestos de alto peso molecular, poco biodisponibles, que soportan el crecimiento de bacterias y hongos que no son muy activos metabólicamente. La diversidad, actividad y especies que habitan la rizosfera varía apreciablemente con la especie de planta.

Aprovechando la capacidad natural de las plantas para excretar compuestos a su rizosfera, se han obtenido plantas y raíces transformadas capaces de producir y excretar biomoléculas y proteínas recombinantes.^{1,24,26} Se ha comprobado también en numerosos estudios, que las plantas son capaces de efectuar los procesos postraduccionales de las proteínas, como acetilación, fosforilación y glicosilación, propios de los animales y demás organismos eucarióticos y que los microorganismos no pueden efectuar.^{1,27,28} Esta característica se ha aprovechado para establecer cultivos de células, tejidos y órganos vegetales transgénicos para la producción de proteínas completas o sus epítomos, antígenos vacunales y anticuerpos.²⁷ De estos cultivos es posible obtener plantas transgénicas productoras de esas biomoléculas, tecnología que se ha denominado Agricultura Molecular (Molecular Farming). En particular, a las plantas transgénicas creadas para la expresión

y suministro de antígenos vacunales, se les ha denominado Vacunas Comestibles, y muchas de éstas se encuentran ya en pruebas a nivel clínico.²⁸

Las ventajas de la producción de biomoléculas por cultivos de células y tejidos vegetales transgénicos son las mismas que se mencionaron arriba para los cultivos no transgénicos, pero adicionalmente, la tecnología de agricultura molecular ofrece la posibilidad de obtener proteínas animales con las modificaciones postraduccionales correctas para obtener la actividad biológica respectiva.

Finalizaremos diciendo que actualmente estamos aplicando estas tecnologías enfocando nuestros esfuerzos a la obtención de compuestos bioactivos como fármacos, antígenos, anticuerpos, y para estudiar los mecanismos remoción de xenobióticos de sitios contaminados con hidrocarburos. Nuestro principal soporte lo constituyen programas sobre ingeniería metabólica de productos naturales y el estudio de la remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales se trabajan de manera conjunta entre el laboratorio de Ingeniería Metabólica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN y el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, de la División de Ingeniería Química y Bioquímica del TESE.

Conclusiones

La supervivencia del hombre en este planeta ha dependido y seguirá dependiendo de las plantas y sus compuestos. Aunque se han investigado intensamente diversas alternativas biotecnológicas para la producción de metabolitos secundarios vegetales o productos naturales por cultivo de células vegetales en biorreactores, sólo algunos procesos se han podido establecer a nivel comercial, debido a que los costos no son comercialmente viables con respecto a las técnicas agrícolas tradicionales de cultivo, aun cuando el rendimiento de varios compuestos en los cultivos *in vitro* es mayor

que en las plantas. El uso de estrategias de Ingeniería Metabólica para incrementar los rendimientos y productividad para la elaboración de productos naturales y transgénicos en plantas o cultivo de células y órganos vegetales, deberá beneficiar espontáneamente a los Bioprocesos y la Agricultura Molecular. Así, la generación de cultivos de células, tejidos y órganos vegetales y plantas transgénicas, ha renovado la esperanza de establecer procesos biotecnológicos, pero ahora no sólo para la producción de los productos naturales, sino también para otros muchos tipos de compuestos bioactivos, como proteínas, anticuerpos y antígenos, y aún más, para la remoción de compuestos tóxicos y nocivos a nuestro medio. 

Bibliografía...

1. Stoger E.; Sack, M.; Fisher R.; Christou, P. (2002). *Current opinion in Biotechnology* 13: 161-166.
2. Hiatt, A.; Cafferkey, R.; Bowdish, K. (1989). *Nature* 342: 76-78.
3. Mason, H.S.; Lam, D. M.; Arntzen, C. J. (1992). *Proc Natl Acad Sci.* 89: 11745-11749.
4. Zhang, G. G.; Rodrigues, L.; Rovinski, B.; White, K. A.. (2002). *Mol Biotechnol.* 20: 131-136.
5. Giddings, G.; Allison, G.; Brooks, D.; Carter, A. (2000). *Nature Biotechnology.* 18: 1151-1155.
6. Franken, E.; Teuschel; U. Hain, R. (1997). *Current Opinion in Biotechnology* 8: 411-416.
7. Salt, D. E.; Blaylock M.; Kumar, N. P.B.A.; Dushenkov, V., Ensley B. D.; Chet I.; Raskin I. (1995). *Biotechnology* 13: 468-474.
8. Bentley R. (1999). Secondary metabolite biosynthesis: the first century. *Crit. Rev. Biotech.* 19: 1-40.
9. Zenk, M. H.; El-Shagi; H. Arens; J. Stöckigt, E. W. Wester; B. Deus (1976). In: «Plant tissue culture and its biotechnological applications» (Barz W.; E. Reinhard and M. H. Zenk, Eds.) pages 27-43. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
10. Alfermann A. W., M. Petersen (1995). *Plant cell, tissue and organ culture.* 43: 199-205.
11. Fowler, M.; Sepan-Sarkissian, G. (1983). *Adv. Biotech. Proc.* 135-158.
12. Yamada Y.; T. Hashimoto (1990). In: «Progress in plant cellular and molecular biology. Proceeding of the VIIIth International Congress on Plant tissue and cell culture» (H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van Der Plass and J. Van Aartijk Eds.) Pags. 547-554. Amsterdam, The Netherlands, 24-29 June. Kluwer Academic Publisher, London, England.
13. Fujita, Y.; S. Takahashi; Y. Yamada (1985). *Agric. Biol. Chem.* 49(6): 1755-1759.
14. DiCosmo, F.; M. Misawa (1995). *Biotech. Adv.* 13(3): 425-453.
15. Taylor, C. B. (1998). *Plant cell.* 10: 641b-644.
16. Stephanopoulos, G. (1994). *Current opinion in biotechnology.* 5: 196-200.
17. Murphy, D. J. (1999). *Current opinion in biotechnology.* 10: 175-180.

18. Campbell, M. M.; Sederoff, R. R. (1996). *Plant Physiol.* 110: 3-13.
19. Heyer, A. G.; Lloyd, J. R.; Kossmann, J. (1999). *Current opinion in biotechnology.* 10: 169-174.
20. Hirschberg, J. (1999). *Current opinion in biotechnology.* 10: 186-191.
21. Yun, D. J.; Hashimoto, T.; Yamada, Y. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11799-11803.
22. Dixon, R. A.; Lamb, C. J.; Masoud, S.; Sewalt, V. J. H.; Paiva, N. L. (1996). *Gene* 179: 61-71.
23. Salt, D. E.; Blaylock, M.; Kumar, N. P. B. A.; Dushenkov, V.; Ensley, B. D.; Chet, I.; Raskin, I. (1995). *Biotechnology* 13: 468-474.
24. Gleba, D.; Borisjuk, N. V.; Borisjuk, L. G.; Kneer, R.; Poulev, A.; Skarzhinskaya, M.; Dushenkov, S.; Logendra, S.; Gleba, Y. Y.; Raskin, I. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5973-5977.
25. Anderson T. A.; E. A. Guthrie and B. T. Walton (1993). *Environ. Sci Technol.* 27 (13): 2630-2636.
26. Shanks, J. V.; Morgan, J. (1999). *Current opinion in biotechnology* 10: 151-155.
27. Trexler, M. M.; McDonald, K. A.; Jackman, A. P. (2002). *Biotechnol. Prog.* 18: 501-508.
28. Giddings, G. (2001). *Current opinion in biotechnology* 12: 450-454.