

# Producción de metabolitos secundarios y proteínas recombinantes a partir del cultivo *in vitro* de células vegetales

Arias, Juan Pablo <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioconversiones, Grupo de Biotecnología Industrial. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias. Calle 59A. No 63-20 Bloque 19A-313 Medellín Colombia. E-mail: [jpariase@unal.edu.co](mailto:jpariase@unal.edu.co)

## Resumen

Los cultivos de células vegetales *in vitro* se han venido perfilando en los últimos años como una estrategia biotecnológica para la obtención de sustancias naturales de alto valor económico, como el caso de metabolitos secundarios, empleados en las industrias química, farmacéutica, alimenticia y cosmética, entre otras, para la elaboración de múltiples productos.

Entre los principales beneficios del cultivo *in vitro* de células vegetales en comparación con los cultivos de especies vegetales en campo, se destaca la disminución en los tiempos de cultivo, implementación de estrategias que permiten incrementar rendimientos, disminución en las etapas y costos de los procesos de extracción y purificación y mayor control en la cantidad y calidad del producto, entre otros. Por otra parte, hay dificultades técnicas específicas para cada especie vegetal, tales como alta variabilidad genética, susceptibilidad a esfuerzos hidrodinámicos, estrés oxidativo, recalcitrancia celular y problemas asociados al escalado.

Actualmente, gracias a los avances en diversas áreas de la ciencia tanto básica como aplicada ha extendido su uso a la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico, debido a que este sistema biológico posee varias ventajas bioquímicas sobre los actuales sistemas de producción de moléculas recombinantes.

**Palabras claves:** células vegetales, metabolitos secundarios, proteínas recombinantes.

## Abstract

*In vitro* plant cell cultures have been emerging in recent years as a biotechnological strategy for obtaining natural substances of high economic value, such as secondary metabolites used in the chemical, pharmaceutical, food and cosmetic industries, among others, for the production of multiple products.

Among the main benefits of the *in vitro* culture of plant cells compared to the cultivations of plant species in the field, we highlight the decrease in cultivation times, implementation of strategies to increase yields, decrease in the stages and costs of the production processes (extraction and purification) and greater control in the quantity and quality of the product, among others. On the other hand, there are specific technical difficulties related to each plant species, such as high genetic variability, susceptibility to hydrodynamic stresses, oxidative stress, cellular recalcitrance and problems associated with the scaled up.

Nowadays, thanks to advances in several areas of basic and applied science, its use has been extended to the production of recombinant proteins of therapeutic interest, because this biological system has several biochemical advantages over the current production systems of recombinant molecules.

**Key words:** plant cell, secondary metabolites, recombinant proteins.

En la actualidad, gran variedad de sustancias naturales vienen siendo empleadas por las industrias química, farmacéutica, alimenticia y cosmética, entre otras, para la elaboración de múltiples productos, los cuales mueven un mercado de miles de millones de dólares al año (Sasson et al., 1992). Los métodos de obtención de estas sustancias son aquéllos que se han venido implementando desde hace muchos años, tales como el cultivo y procesamiento de plantas completas, lo cual resulta costoso y dispendioso en muchos casos. También se han desarrollado procesos de síntesis o semi-síntesis química de varias de estas sustancias, pero estos han mostrado ser igualmente dispendiosos y costosos dada la gran cantidad de etapas que requieren.

El cultivo de células vegetales surge como una alternativa que muestra tener, como principales ventajas, la posibilidad de proveer de manera continua y reproducible productos naturales de interés, dejando a un lado todas las variables que afectan a los cultivos *in vivo*, como las condiciones climáticas, las condiciones del suelo, el ataque de plagas y problemas geopolíticos que puedan presentar ciertas regiones, logrando así tener un mayor control de las sustancias de interés y optimizando tiempo y dinero en su obtención.

Actualmente hay diversos cultivos de células vegetales a escala industrial, tales como *Lithospermum erythrorhizon* para la producción de shikonina, en donde una sola corrida de 14 días en un fermentador de 750 L produce la misma cantidad de shikonina que la obtenida en un cultivo en campo de 176.400 m<sup>2</sup>, *Taxus* sp. para obtención de Taxol y *Panax ginseng* para la obtención de ginsenósidos, entre otros (Arias et al., 2009). Sin embargo, los cultivos de células vegetales, por ser tan específicos de cada especie, se encuentran en constante desarrollo e investigación, sobrellevando características no muy deseables que presentan algunos de ellos, como bajas productividades, crecimiento lento de las células, inestabilidad genética y pobre control de la diferenciación, entre otros, lo cual ha dificultado su implementación a escala industrial (Sajc et al., 2000).

Para tratar de superar las desventajas anteriormente descritas, se ha venido incursionado en estrategias que permitan incrementar la producción de biomasa y metabolitos secundarios, destacándose la selección y mejoramiento de líneas celulares, estudios a nivel genético y de rutas metabólicas, así como de los requerimientos fisicoquímicos de los cultivos, dentro de los cuales se pueden mencionar la naturaleza y concentración de la fuente de carbono, la iluminación, el pH, la velocidad de agitación, la aireación y otros requerimientos que pueden ir surgiendo al momento de escalar el proceso.

### **Tipo de cultivos de células vegetales**

Los diferentes tipos de cultivos vegetales que se han reportado en la bibliografía para la producción de metabolitos secundarios y/o proteínas recombinantes son el cultivo de órganos o tejidos (brotes, raíces o pelos radicales), cultivo de células en suspensión y el cultivo de células inmovilizadas.

Los cultivos de brotes y raíces son ampliamente usados para la obtención de células diferenciadas mediante regulación hormonal con diferentes combinaciones de auxinas o citoquininas. En efecto, estos cultivos producen a menudo los mismos metabolitos secundarios que la planta intacta (Verpoorte et al., 1999).

Los pelos radicales o “hairy roots” son un tipo de cultivo celular que se genera debido a la infección de las células por *Agrobacterium rhizogenes* generando proliferación celular en forma de raíces. Las principales características de este cultivo son rápido crecimiento en medio libre de hormonas y estabilidad genética y bioquímica, entre otras (Shanks & Morgan, 1999). La mayor desventaja de estos cultivos es la dificultad de garantizar su crecimiento a mayor escala, lo cual hace necesario la implementación y diseño de biorreactores específicos para los mismos (Ramachandra & Ravishankar, 2002).

Las suspensiones celulares consisten de células libres y pequeños agregados celulares en un medio de cultivo líquido en constante movimiento, siendo esta una de las formas para mantener y propagar células vegetales, proporcionando un ambiente de cultivo uniforme, eliminando los gradientes de nutrientes que se presentan en los cultivos en medio sólido y garantizando la disponibilidad de nutrientes para todas las células, pero a su vez teniendo un relativo bajo control sobre el tamaño de los agregados celulares.

Los cultivos de células inmovilizadas consisten en células o agregados celulares que se adhieren a una matriz ya sea en geles de carbonato o separadas en soportes de polímeros rígidos. La inmovilización proporciona una mayor cantidad de células por volumen del reactor, obteniendo una alta productividad volumétrica de células y productos; además, se elimina el problema de “lavado” celular en cultivos continuos, lo cual permite trabajar a mayores tasas de dilución y aumentar el rendimiento de los procesos de recuperación y purificación de los metabolitos, se reducen los esfuerzos de corte, se minimiza la viscosidad de los fluidos, y los

riesgos de contaminación se ven ligeramente disminuidos (DiCosmo y Misawa, 1995).

### **Biorreactores para el cultivo de células vegetales**

Algunas de las desventajas que presentan los cultivos de células vegetales en biorreactores son las bajas tasas de crecimiento, la inestabilidad genética y el pobre control que se tiene en la diferenciación celular; estos parámetros están ampliamente relacionados con ciertas condiciones físicas que se presentan al momento de realizar el cultivo en biorreactores a escala industrial, como los esfuerzos de corte y la transferencia de oxígeno, entre otros. Dada la complejidad de estos fenómenos, para poder alcanzar condiciones óptimas de cultivo se requiere de un trabajo interdisciplinario que involucre áreas como biología celular y molecular, fisiología vegetal, genética e ingeniería, para conocer detalladamente la morfología y composición del tejido, las condiciones de flujo y transferencia de masa y calor, la cinética del crecimiento y formación de producto, alcanzar la estabilidad genética de las líneas hiperproductoras y controlar el micro y macro ambiente celular, así como optimizar los procesos de purificación y separación (Sajc et al., 2000).

Aunque son diversas las aproximaciones para lograr un adecuado establecimiento de cultivos de células vegetales en suspensión en biorreactor como tipo de biorreactor, medio de cultivo, temperatura, requerimiento de oxígeno, nutrientes, entre otras, (Ruffoni et al., 2010), la agitación y el esfuerzo de corte han sido blanco de diversos estudios pues son variables que se han identificado como de gran importancia al momento de pensar en el escalado de los procesos y deben ser evaluadas para cada especie vegetal trabajada.

### **Caso de estudio: *Thevetia peruviana***

En el Laboratorio de Bioconversiones de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín se han desarrollado diversos estudios enfocados al establecimiento de cultivos *in vitro* de células de la especie vegetal *Thevetia peruviana* en callo, suspensión (Arias et al., 2009b) e inmovilizadas (Aguirre, 2010). Se ha evaluado el efecto de las condiciones de cultivo, iluminación (Arias, et al., 2016), y adición de elicitores (Arias et al., 2009) sobre la producción de glicosidos cardiotónicos y compuestos fenólicos. Se han desarrollado modelos matemáticos que explican el comportamiento cinético de las células a escala de matraz agitado (Villegas et al., 2017). Actualmente se está trabajando en la identificación de rutas metabólicas encargadas de la síntesis de algunos de estos metabolitos, así como en el escalado de los cultivos en reactor de tanque agitado.

### **Bibliografía**

Aguirre, A. (2010). Aporte al estudio de la producción de peruvósido y otros metabolitos secundarios en cultivos de células de *Thevetia peruviana* en suspensión e inmovilizadas. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín. Tesis de Maestría en Ciencias- Biotecnología.

Arias, M., Angarita, M., Aguirre, A., Restrepo, J., & Montoya, C. (2009). Strategies for the improvement of secondary metabolites in plant cell cultures. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 62(1), 4881–4895.

Arias, M., Angarita, M., Restrepo, J., Caicedo, L., & Perea, M. (2009b). Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 46(3), 233–238.

Arias JP, Zapata K, Rojano B, Arias M (2016). Effect of light wavelength on cell growth, content of phenolic compounds and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *J Photochem Photobiol B Biol* 163:87–91. doi:doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.08.014

DiCosmo, F., & Misawa, M. (1995). Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*. 13(3), 425–453.

Ramachandra R., & Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 20(2), 101–53.

Ruffoni, B., Pistelli, L., Bertoli, A., & Pistelli, L. (2010). Plant cell cultures: bioreactors for industrial production. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 698, 203–21.

Sajc, L., Grubisic, D., & Vunjak, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: An outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*. 4(2), 89–99.

Sasson, A., Silva, E., & Ratledge, C. (1992). Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: Biotechnological and economic aspects. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires*. 14, 59-74

Shanks, J. & Morgan, J. (1999). Plant “hairy root” culture. *Current Opinion in Biotechnology*. 10(2), 151–5.

Verpoorte, R., & Heijden, R. (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology*. 21, 467–479.

Villegas, A., Arias, J.P., Aragón, D. et al. (2017). Structured model and parameter estimation in plant cell cultures of *Thevetia peruviana* *Bioprocess Biosyst Eng* 40: 573. doi:10.1007/s00449-016-1722-6