

## 5.- PRODUCCIÓN DE METABOLITOS

### 5.1. SUSTANCIAS SINTETIZADAS POR PLANTAS Y CULTIVOS VEGETALES

#### 5.1.1. Generalidades

Además de las rutas del metabolismo primario, idénticas o similares en todos los organismos vivos, los vegetales tienen otras vías metabólicas que llevan a la formación de compuestos característicos de un grupo taxonómico y cuya función no guarda relación con los procesos vitales de la célula que los biosintetiza, pero puede tener significación para el organismo productor como un todo. Estas rutas constituyen el metabolismo secundario (*Figura 4*). Las enzimas involucradas tendrán el carácter de metabolitos primarios o secundarios, dependiendo de su función metabólica (Illanes, 1994).

La biosíntesis de metabolitos secundarios suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a períodos de estrés (Piñol & Palazón, 1993). Algunas células vegetales producen metabolitos secundarios importantes en las interacciones de la planta con el medio ambiente (protección frente a depredadores, patógenos o estrés ambiental) o que están relacionadas con la maquinaria reproductiva de la planta (atracción de insectos para la promoción de la polinización). Muchos de estos productos secundarios tienen uso en la industria farmacéutica y en la producción de tests de diagnóstico, de fragancias, de aditivos alimentarios y de biocidas en general.

Lo anteriormente mencionado explica el interés de la industria en la producción de compuestos naturales cuya calidad y costos no sea afectada por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción. Es en este contexto que los cultivos de células y tejidos vegetales constituyen una alternativa para producir sustancias cuya producción comercial por los métodos convencionales resulta difícil, escasa o económicamente poco viable (Robert *et al.*, 1991). En la *Tabla 3* se muestra la variedad de metabolitos obtenidos por cultivo *in vitro* de células vegetales.

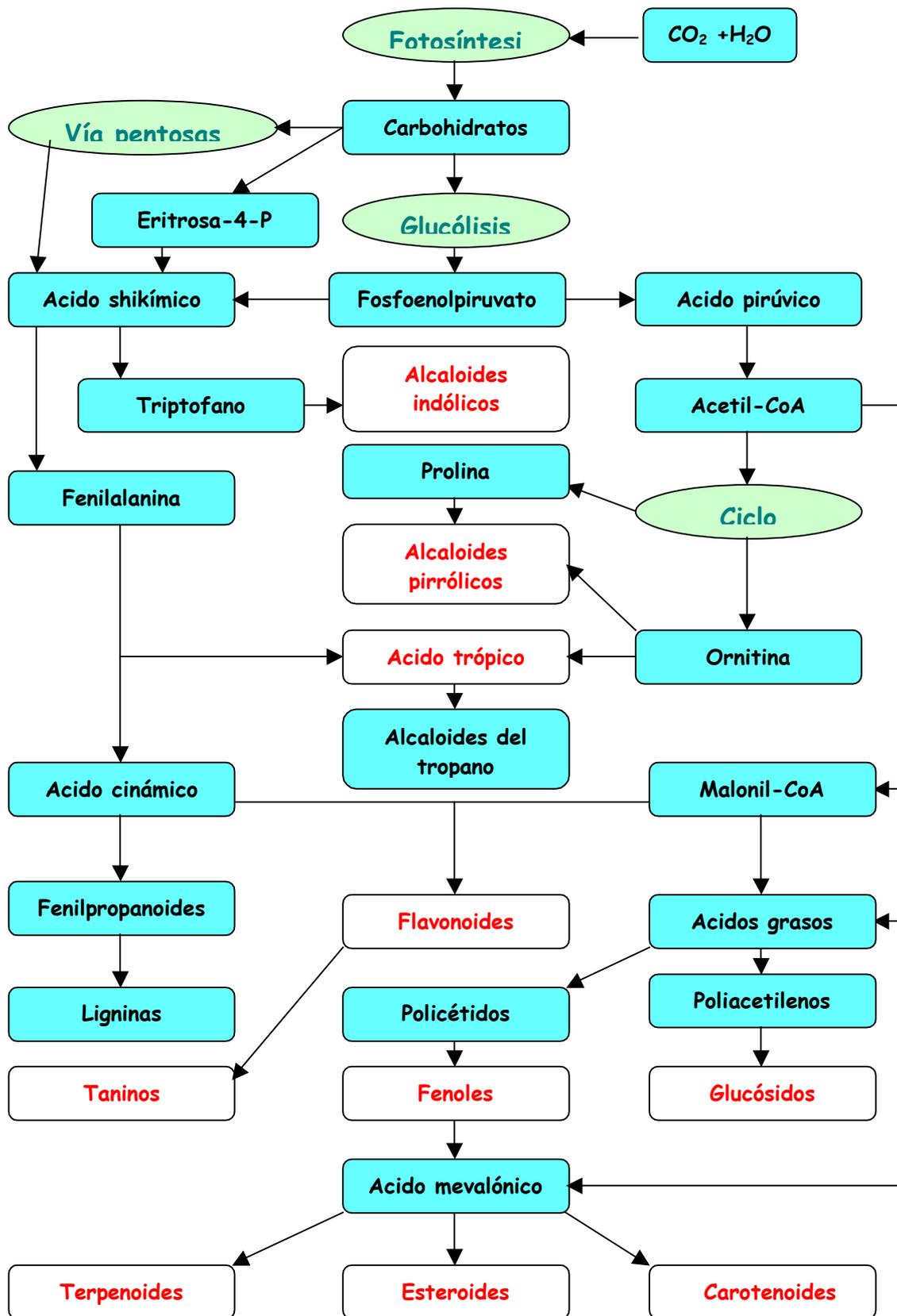


Figura 4.- Principales interrelaciones entre metabolismo primario y secundario de las células vegetales (Adaptado de Robert *et al.*, 1991; Paniego, 1995).

**Tabla 3.-** Metabolitos secundarios producidos por cultivos *in vitro* de células vegetales (Fowler & Stafford, 1992; Giulietti & Ertola, 1999)

| Compuestos químicos | Producto                             | Especie vegetal  |
|---------------------|--------------------------------------|--|
| <b>Alcaloides</b>   |                                      |  |
| Indólicos           | Catarantina, Ajmalicina<br>Quinamina | <i>Catharanthus roseus</i><br><i>Cinchona spp.</i>                             |
| Isoquinólicos       | Berberinas                           | <i>Berberis spp.</i>   |
| Piridínicos         | Nicotina                             | <i>Nicotiana tabacum</i>   |
| Tropánicos          | Hyosciamina,<br>Escopolamina         | <i>Hyoscyamus tuberosum</i><br><i>Duboisia, Atropa, Datura y Scopolia spp.</i> |
| Purínicos           | Cafeína                              | <i>Coffea arabica</i>  |
| <b>Otros</b>        |                                      |  |
| Monoterpenos        | Anetol                               | <i>Pimpinella anisum</i>   |
| Sesquiterpenos      | Paniculina<br>Artemisina             | <i>Andrographis paniculata</i><br><i>Lippia, Artemisia y Datura spp.</i>       |
| Poliacetilenos      | Tiofenos                             | <i>Coreopsis, Bidens y Tagetes spp.</i>  |
| Esteroides          | Diosgenina<br>Ginsenósidos           | <i>Dioscorea deltoidea</i><br><i>Solanum y Panax spp.</i>                      |
| Flavonoides         | Antocianinas                         | <i>Vitis vinifera</i>  |
| Antraquinonas       | Varios<br>7-metilpurpurina           | <i>Galium mollugo</i><br><i>Digitalis y Cassia spp.</i>                        |
| Naftoquinonas       | Shikonina                            | <i>Lithospermum erythrorhizon</i>  |
| Lignanos            | Etoposido                            | <i>Podophyllum y Linum spp.</i>  |

Los cultivos celulares vegetales no siempre producen sustancias cualitativa- y cuantitativamente iguales a las elaboradas por las plantas madres. La producción y el perfil de compuestos químicos puede ser inestable, debido a que dentro de la planta entera las células vegetales tienen un entorno bioquímico y fisiológico diferente al de las células que crecen en medios de cultivo. Además, como muchos de los metabolitos se sintetizan integrados a los eventos de diferenciación, algunas veces se necesita de algún grado de organización en los cultivos para que el metabolito se sintetice (Misawa, 1985).

La producción de metabolitos por cultivo de tejidos vegetales puede estar asociada al crecimiento (producción y crecimiento simultáneos) o ser independiente de él. Se ha observado que esta relación puede no mantenerse a través del tiempo o ser afectada por la adición de reguladores de crecimiento o el cambio de escala.

Por otro lado, bajo las condiciones ambientales y de estrés impuestas por el cultivo *in vitro* pueden producirse compuestos químicos diferentes a los de las plantas madres, por la expresión de vías metabólicas diferentes. Esta potencialidad genética incluye una alta variedad de estructuras químicas, algunas de ellas con actividad biológica (*Tabla 4*).

**Tabla 4.-** Nuevos compuestos encontrados en cultivos de tejidos vegetales (Fowler & Stafford, 1992; Paniago, 1995)

| Clase química   | Compuesto                | Aplicación potencial | Especie vegetal                |
|-----------------|--------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Alcaloide       | Armorina                 |                      | <i>Stephania cepharantha</i>   |
| Alcaloide       | Norcefaradiona           |                      | <i>Stephania cepharantha</i>   |
| Alcaloide       | Rauglucin                | Anti-hipertensivo    | <i>Rauwolfia serpentina</i>    |
| Alcaloide       | Epcrosina                |                      | <i>Ochrosia elliptica</i>      |
| Alcaloide       | N-metilajmalina          | Anti-hipertensivo    | <i>Catharanthus roseus</i>     |
| Alcaloide       | Ajmalicina               | Antiácido            | <i>Beberis stolonifera</i>     |
| Alcaloide       | Pseudoindoxil-ajmalicina | Cardiotónico         | <i>Daucus carota</i>           |
| Terpenoide      | Dihomovalerato           |                      | <i>Valeriana wallichii</i>     |
| Terpenoide      | Paniculina A             |                      | <i>Andrographis paniculata</i> |
| Terpenoide      | Honokiol                 |                      | <i>Thuja occidentalis</i>      |
| Terpenoide      | Tarenósido               |                      | <i>Garenia jasminoides</i>     |
| Antraquinona    | Lucidina                 |                      | <i>Morinda citrifolia</i>      |
| Fenilpropanoide | Rutacultina              |                      | <i>Ruta graveolens</i>         |
| Fenilpropanoide | Podoverina               |                      | <i>Podophyllum versipelle</i>  |

### 5.1.2. Producción de proteínas

Numerosos trabajos identifican patrones proteicos específicos en cultivos de callos o embriones somáticos de varias plantas, que varían según la especie, el fenotipo, el estado del desarrollo y las condiciones de cultivo. Ejemplos de ello se encuentran en *Nicotiana suaveolens* (Espino & Vazquez, 1985), *Phaseolus vulgaris* (Del Grosso *et al.*, 1987) *Pisum sativum* (Stirn & Jacobsen, 1987), *Pedilanthus tithymaloides* L. (Bricage, 1988), *Daucus carota* (Schnall *et al.*, 1991), *Populus deltoides* (Coleman & Ernst, 1991) y *Phoenix dactylifera* L. (Baaziz *et al.*, 1994).

En cuanto a la producción de enzimas por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se puede destacar el interés por la producción de peroxidasas, dada la aplicación analítica de estas enzimas en tests de diagnóstico médico, como así también en el tratamiento de compuestos recalcitrantes (Flocco *et al.*, 1999). Así, por ejemplo, se obtuvieron peroxidasas a partir de cultivos de células en suspensión de maní (Sesto & van Huystee, 1989), de rabanito (Moreno *et al.*, 1989), de pimiento (Cuenca *et al.*, 1989), de remolacha azucarera (Kevers *et al.*, 1983), de tabaco (Mader & Walter, 1986), de zanahoria (Joersbo *et al.*, 1989), de alfalfa (Gazaryan *et al.*, 1991), de cacao y de cretona (Spencer *et al.*, 1993), de batata (Kwak *et al.*, 1995), de cebada (Blinda *et al.*, 1996), de arándano (Melo *et al.*, 1996) y muchas otras especies. También se aislaron peroxidasas de cultivos en suspensión de rábano picante (*Armoracia rusticana*), la especie vegetal cuyas raíces son habitualmente usadas como fuente de esta enzima con fines comerciales (Yamada *et al.*, 1987; Parkinson *et al.*, 1990; Dix *et al.*, 1993) y de *Humulus lupulus* (Trevisan *et al.*, 1997).

En cultivos de raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* se obtuvieron peroxidasas de *Armoracia rusticana* (Parkinson *et al.*, 1990; Kato *et al.*, 1991) de *Armoracia lapathifolia* (Saitou *et al.*, 1991; Alvarez *et al.*, 1995; Flocco *et al.*, 1998), de *Solanum nigrum* (Macek *et al.*, 1996) y de *Daucus carota* (Kim & Yoo, 1996).

#### 5.1.2.1. Producción de peptidasas por cultivos *in vitro* de células vegetales

La producción de peptidasas por cultivo de tejidos ha sido estudiada en papaya (Medora *et al.*, 1973), ananá (Apte *et al.*, 1979), hierba lechera (Knorr & Miazga, 1987), higo (Cormier *et al.*, 1989), poroto (Kim & Minamikawa, 1997) y cardos como *Cynara cardunculus* L. (Cordeiro *et al.*, 1993; Lima Costa *et al.*, 1996) y *Onopordum turcicum* (Tamer & Mavituna, 1996).

En el caso del ananá (*Ananas sativus*) se realizaron estudios comparativos de la actividad proteolítica de la bromelina en tejidos no organizados, en hojas de plantas regeneradas *in vitro* y en hojas de plantas maduras. La actividad proteolítica en callos y

en hojas de plantas regeneradas *in vitro* fue semejante pero cuantitativamente menor que la de hojas de plantas maduras (Apte *et al.*, 1979).

El cultivo de callos de higo (*Ficus carica*) produce una peptidasa cisteínica con propiedades térmicas e hidrolíticas similares a las que presenta la ficina comercial que habitualmente se obtiene del látex de higos inmaduros (Cormier *et al.*, 1989). También producen peptidasas cisteínicas los cultivos de tejidos de *Carica papaya* ("papaya"; Medora *et al.*, 1973) y *Asclepias syriaca* ("hierba lechera"; Knorr & Miazga, 1987).

Las células en suspensión de *Phaseolus vulgaris* producen peptidasas serínicas y cisteínicas, incrementándose la actividad cisteínica al agregar ácido giberélico al medio de cultivo (Kim & Minamikawa, 1997).

Por otro lado, las peptidasas obtenidas en cultivo de suspensiones celulares de *Cynara cardunculus* L. muestran una gran heterogeneidad y propiedades diferentes que las enzimas de las flores (Cordeiro *et al.*, 1993) mientras que la actividad proteolítica observada por Tamer & Mavituna (1996) en cultivos de callos y suspensiones celulares de *Onoprodum turcicum* fue mayor que la observada en hojas y semillas de la planta.

#### 5.1.2.2. Producción de proteínas recombinantes por plantas transgénicas

Las plantas transgénicas son comúnmente producidas utilizando alguno de los siguientes métodos: transformación mediada por *Agrobacterium spp.* o bombardeo de micropartículas recubiertas con ADN. Con cualquiera de estas técnicas, fragmentos del ADN extraño pueden insertarse en el genoma vegetal, habiéndose demostrado que las plantas expresan, arman, pliegan y modifican postranscripcionalmente proteínas extrañas con alta fidelidad. Los avances en la biología molecular de plantas y el uso de éstas como biorreactores permiten la producción de proteínas recombinantes que incrementan la resistencia a los patógenos o mejoran la calidad nutricional de las plantas transgénicas. Además puede inducirse la producción de polipéptidos de uso técnico o farmacéutico (Hammond, 1999; Herbers & Sonnewald, 1999; Doran, 2000).

Las **plantas insecticidas** se han obtenido por la expresión de la  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, de  $\alpha$ -amilasa, de polifenol oxidasas, de quitinasas y de inhibidores de peptidasas que interfieren en el metabolismo de los insectos. Una de las ventajas de esta metodología sobre la clásica pulverización de insecticidas es que sólo serán afectados los insectos que ataquen el cultivo, no siendo perjudicados los insectos involucrados en la polinización de estas especies (Hammond, 1999; Herbers & Sonnewald, 1999).

La estrategia más utilizada para introducir **resistencia a los virus** es la que involucra la expresión del gen que codifica la proteína de cubierta de algunos virus y en

este sentido se han transformado la papa, el arroz, la papaya, el tabaco y el frijol. Otros procedimientos que resultan efectivos contra algunas virosis utilizan ARN antisentido, genes no virales y proteínas inactivantes de los ribosomas (RIPs) (Hammond, 1999; Herbers & Sonnewald, 1999).

La **resistencia a bacterias y a hongos patógenos** se induce generalmente interfiriendo con la integridad de la pared celular o de la membrana del patógeno. Así, mediante la expresión de proteínas antifúngicas (quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas) se puede incrementar la resistencia de las plantas a ciertos hongos (Gil Díaz *et al.*, 1998; Hammond, 1999).

Las **plantas resistentes a herbicidas** se han logrado mediante la expresión de enzimas que reducen los efectos tóxicos de esos productos químicos, por la sobreexpresión de las enzimas sensibles al herbicida o a través de la expresión de enzimas mutadas insensibles al mismo (Gil Díaz *et al.*, 1998). Así, Mannerlöf *et al.* (1997) obtuvieron plantas transgénicas de *Beta vulgaris* L. tolerantes al glifosato (herbicida de amplio espectro) utilizando genes de bacterias que degradan el glifosato a productos no tóxicos para la planta.

Nuevas proteínas con alto contenido de los aminoácidos metionina y lisina se han expresado en semillas transgénicas con la finalidad de **mejorar la calidad nutricional** de las plantas. Para ello se han seguido dos tipos de estrategias: 1) expresión de proteínas con alto contenido de metionina y/o lisina por modificación de la estructura primaria de la proteína endógena y 2) expresión heteróloga de proteínas ricas en dichos aminoácidos. Por ejemplo, para incrementar el contenido de metionina de la papa se utilizó el cADN de un mutante rico en metionina de la albúmina 2S de nuez (Herbers & Sonnewald, 1999).

Las **enzimas de uso industrial** producidas por plantas transformadas son principalmente aquellas que degradan la pared celular, el almidón y el fitato (*Tabla 5*). Las hidrolasas de la pared celular juegan un importante rol en la industria alimentaria, del papel, de la madera y de las bebidas. La  $\alpha$ -amilasa es usada principalmente en la manufactura de alimentos y detergentes y el fitato, principal forma de almacenamiento del fósforo en las plantas, necesita ser hidrolizado por fitasas para incrementar el valor nutricional de los alimentos para animales monogástricos.

**Tabla 5.-** Enzimas de uso industrial producidas en plantas transformadas estables (Herbers & Sonnewald, 1999)

| Enzima                      | Origen del gen                    | Planta |
|-----------------------------|-----------------------------------|--------|
| $\alpha$ -amilasa           | <i>Bacillus licheniformis</i>     | Tabaco |
| Fitasa                      | <i>Aspergillus niger</i>          | Tabaco |
| Fitasa                      | <i>Aspergillus niger</i>          | Soja   |
| $\beta$ (1,3-1,4) glucanasa | <i>Ruminococcus flavefaciens</i>  | Tabaco |
| $\beta$ (1,3-1,4) glucanasa | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Cebada |
|                             | <i>Bacillus macerans</i>          |        |
| $\beta$ (1,4) xilanasa      | <i>Clostridium thermocellum</i>   | Tabaco |
| $\beta$ (1,4) xilanasa      | <i>Ruminococcus flavefaciens</i>  | Tabaco |

También las plantas transgénicas pueden producir **vacunas** al expresar antígenos que desencadenan inmunidad por vía oral si los tejidos vegetales son consumidos como alimentos. Se ha demostrado en estudios clínicos preliminares que esas proteínas antigénicas producen una respuesta inmune específica en el caso de la vacuna de papa contra el cólera. Además existen evidencias que las plantas transgénicas se pueden utilizar para inducir inmunotolerancia, lo cual podría resultar efectivo en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes (Richter & Kipp, 1999).

Para incrementar los niveles de expresión en la planta y reducir los costos de purificación, la cubierta proteica de los virus del mosaico del tabaco y del mosaico de la alfalfa han sido usado como "carriers" para la expresión de péptidos antigénicos (Herbers & Sonnewald, 1999).

Otros antígenos que han sido producidos en plantas transgénicas incluyen la cápside del virus Norwalk (agente causal de gastroenteritis aguda) en tabaco y papa, un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en tabaco, una subunidad de la toxina de *E. coli* enteropatógena en papa y tabaco y la subunidad B de la toxina del *Vibrio cholerae* en papa (Herbers & Sonnewald, 1999).

A su vez, se han obtenido plantas transgénicas que sintetizan **proteínas terapéuticas recombinantes** como proteínas séricas, reguladores del crecimiento, enzimas lisosomales, antibióticos y anticoagulantes (*Tabla 6*). Varias de estas proteínas son funcionales y estructuralmente comparables a las proteínas análogas producidas en humanos. La expresión de biofarmacéuticos por plantas transgénicas es quizás la tecnología de mayor potencial económico y social, debido a que los productos requieren en general bajos costos de purificación, se producen en mayores cantidades que a partir de tejidos, no requieren cadena de frío y el abastecimiento puede ser ilimitado. Al

comparar con la producción por cultivos microbianos, con cultivos de células animales y con la extracción desde tejidos animales, la principal ventaja reside en la seguridad sanitaria de estos medicamentos, pues las plantas no son hospedantes de la mayoría de los patógenos humanos que se transmiten por sangre o por tejidos animales, como el HIV o los priones responsables de la encefalopatía espongiforme (Cramer *et al.*, 1999).

**Tabla 6.-** Producción de proteínas terapéuticas en plantas transgénicas (Cramer *et al.*, 1999)

| Producto transgénico               | Uso potencial  | Planta huésped | Actividad funcional                     |
|------------------------------------|--|----------------|---|
| Hemoglobina ( $\alpha$ y $\beta$ ) | Sustituto sanguíneo  | Tabaco         | Sí (une $O_2/CO_2$ )                    |
| Albúmina sérica humana             | Sustituto sanguíneo  | Papa           | NT                                      |
| Proteína C                         | Anticoagulante   | Tabaco         | NT                                      |
| $\alpha$ -interferon               | Protección viral y anticancerígeno   | Arroz          | Sí (ensayo de resistencia viral)        |
| $\gamma$ -interferon               | Activación de fagocitos  | Tabaco         | Sí (ensayos in vitro)                   |
| GM-CSF                             | Leucopoyesis en trasplante de médula ósea, quimioterapia del cáncer y del SIDA | Tabaco         | Sí (estimula el crecimiento de células) |
| Factor de crecimiento epidérmico   | Mitógeno   | Tabaco         | NT                                      |
| $\alpha$ -galactosidasa            | Enfermedad de Fabry  | Tabaco         | Sí (actividad enzimática)               |
| Glucocerebrosidasa                 | Enfermedad de Gaucher  | Tabaco         | Sí (actividad enzimática)               |
| Caseína                            | Nutrición  | Papa           | NT                                      |
| Hirudina                           | Anticoagulante   | Canola         | Sí (inhibición de trombina)             |
| NP1 defensina                      | Antibiótico  | Tabaco         | Sí (actividad antibiótica)              |
| Eritropoyetina                     | Mitógeno hematopoyético  | Tabaco         | No                                      |
| Glutamato descarboxilasa           | Diabetes   | Tabaco         | Sí (en ratón)                           |

GM-CSF (factor estimulante de granulocitos y macrófagos). NT: no testado

La mayoría de los trabajos destinados a la obtención de plantas transgénicas productoras de potenciales proteínas terapéuticas han utilizado el promotor 35S derivado del virus del mosaico del coliflor y especies vegetales fácilmente modificables genéticamente, como la papa y el tabaco.

En este punto es preciso aclarar que la producción de plantas transgénicas sigue suscitando reacciones muy diferentes. Para muchos de sus defensores, esta producción resulta indispensable para lograr una agricultura sustentable que permita el acceso de toda la población a los alimentos y medicamentos. Sus detractores temen por las consecuencias, en especial las ecológicas, de la ingeniería genética y que los avances en este campo vuelva a los países en desarrollo aún más dependientes de las naciones industrializadas. Para evitar los efectos negativos es necesario establecer sistemas regulatorios de salud pública en todos los países, con el fin de identificar y supervisar cualquier efecto nocivo potencial de las plantas transgénicas.

## **5.2. ESTRATEGIAS PARA MANIPULAR LA CAPACIDAD BIOSINTÉTICA DE LOS CULTIVOS VEGETALES**

Para que el cultivo de células vegetales tenga aplicación en la producción industrial de metabolitos, se requiere que éstos se puedan producir en cantidades apreciables y que la producción se mantenga en el tiempo (estabilidad). Sin embargo la mayoría de los cultivos celulares producen estos compuestos en niveles inferiores a los producidos por las plantas de los cuales derivan (Robert *et al.*, 1991).

Por lo tanto, después de haber estudiado y establecido el sistema de cultivo para la producción de un metabolito determinado, se deben desarrollar estrategias que permitan aumentar su rendimiento. Esto se puede lograr utilizando diferentes métodos físicos, químicos o genéticos (Fowler & Stafford, 1992).

### **5.2.1. Selección de líneas celulares productoras de enzimas y metabolitos**

Las células vegetales en cultivo pueden representar una población heterogénea con características fisiológicas diferentes, debido a que en los repetidos subcultivos sólo se han seleccionado las células basándose en la tasa de crecimiento. Debido a ello es que debe realizarse una selección de líneas productoras del metabolito deseado, pues es bastante común encontrar diferencias en los niveles productivos de las diferentes líneas celulares (Warren, 1992).

Para establecer cultivos productores se aconseja obtenerlos a partir de plantas altamente productoras (Zenk *et al.*, 1977), aunque algunos autores no encontraron mayores diferencias partiendo de plantas con alto o bajo contenido del compuesto deseado (Roller, 1978; Kinnersly & Dougall, 1980).

Con la finalidad de explotar la variabilidad intrínseca de las plantas se deberían establecer cultivos a partir de diferentes explantos, de plantas con localizaciones geográficas diferentes y de distintas variedades (Creche *et al.*, 1987). También se deben probar diferentes medios y desarrollar distintos tipos de cultivos *in vitro* (callos, suspensiones celulares, protoplastos, cultivos diferenciados).

A menudo los cultivos *in vitro* que producen niveles elevados de metabolitos son inestables y para conservarlos se deben realizar selecciones repetitivas; esto puede deberse a que las células sobreproductoras tendrían una velocidad de crecimiento menor que conduciría a su eliminación por dilución al hacer los subcultivos (Robert *et al.*, 1991). Por lo tanto, una vez iniciados los cultivos se deben seleccionar las variantes altamente productoras y estables en la producción de metabolitos (Kurz *et al.*, 1985).

### 5.2.2. Optimización de las condiciones de cultivo

La optimización de la productividad de un cultivo depende de la manipulación de condiciones físicas y de elementos nutricionales del mismo. Muchas veces es necesario establecer un régimen de cultivo en dos etapas para lograr una mayor producción de metabolitos específicos. La primera involucra el crecimiento de las células en un medio de incremento de la biomasa y la segunda la transferencia de esas células a un medio de producción, en el que se active el camino metabólico del metabolito deseado (Morris *et al.*, 1985). En varios trabajos con diferentes especies vegetales se ha demostrado que las condiciones culturales que promueven una alta tasa de división celular generalmente no conducen a una elevada formación de productos secundarios. Esta relación inversa entre las síntesis de proteínas y de metabolitos secundarios se puede explicar por la utilización diferencial y antagónica de precursores comunes (Yeoman *et al.*, 1990; Fowler & Stafford, 1992; Constabel & Tyler, 1994 y Ertola *et al.*, 1994).

El tipo y la concentración de la fuente de carbono afecta no sólo el crecimiento celular sino también el rendimiento de productos, aunque no siempre de una forma predecible. Así, una alta concentración de sacarosa (10 % p/v) estimula la síntesis de antraquinona en varias especies de *Galium*, pero inhibe la producción en otras y la acumulación de alcaloides indólicos en cultivos de *Catharanthus roseus* fue óptima con 8 % de sacarosa al estudiar el rango 4-12 % (Fowler & Stafford, 1992; Ertola *et al.*, 1994).

En cuanto a la concentración de fosfatos, se observa que los niveles altos favorecen el crecimiento de los cultivos, pero tienen un efecto negativo sobre la formación de metabolitos secundarios, mientras que los niveles bajos pueden favorecer la acumulación de metabolitos (Mantell & Smith, 1983). Ejemplos de esto lo constituyen el incremento de cinamoilputrescina por *Nicotiana tabacum* y la estimulación de la

producción de alcaloides por *Catharanthus roseus* cuando disminuye el nivel de fosfatos en el medio de cultivo (Ertola *et al.*, 1994). El nivel de fosfato también afecta la acumulación de antocianinas en cultivos celulares de *Daucus carota* y *Vitis vinifera* y la acumulación de antraquinonas en suspensiones de *Galium mollugo* (Fowler & Stafford, 1992)

La limitación en la fuente de nitrógeno (sales de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o hidrolizado de caseína) tiende a suprimir el crecimiento y en algunos sistemas a aumentar la síntesis del producto deseado (Morris *et al.*, 1985). Se observa también que la sustitución de nitrógeno inorgánico por nitrógeno orgánico (peptonas, extracto de levadura) incrementa la producción de algunos alcaloides (Dougall, 1980). Existen varios ejemplos en la literatura sobre la influencia de la relación nitrato/amonio en la producción de metabolitos secundarios. Así, la presencia de amonio en el medio de cultivo anula la producción de shikonina por las células en suspensión de *Lithospermum erythrorhizon* (Fujita *et al.*, 1981), mientras que la relación óptima de Noxidado/Nreducido para la producción de berberina por suspensiones de *Thalictrum minus* es de 1:2 (Nakagawa *et al.*, 1984) y de 2:1 para producir solasodina por células en suspensión de *Solanum eleagnifolium* (Nigra *et al.*, 1990).

La concentración de nitrógeno afecta generalmente el nivel de producción de aminoácidos y compuestos proteicos. Al respecto, Misawa (1985) describe que el rendimiento de inhibidores de peptidasas por cultivos de *Scopolia japonica* y de sustancias antivíricas por *Phytolacca americana* fue significativamente afectada por los niveles de los compuestos nitrogenados incorporados en el medio. También se puede incrementar el nivel de L-glutamina acumulada en células de *Symphytum officinale* al elevar la concentración de nitrógeno (Fowler & Stafford, 1992)

Por otro lado es importante la manipulación de las condiciones ambientales, debiendo estudiarse el efecto de la intensidad, el fotoperíodo y la longitud de onda de la luz, de la temperatura y de la aireación. Así, la biosíntesis de flavonoides y antocianinas es usualmente favorecida por una alta y continua intensidad de luz, mientras que en otros casos se requiere realizar el cultivo en oscuridad. En cuanto a la temperatura, hay que considerar que muchas veces la tasa de crecimiento y la acumulación de producto presentan temperaturas óptimas diferentes (Morris *et al.*, 1985).

La aireación es otro factor que puede afectar la producción de metabolitos, debiendo optimizarse su tasa para permitir tanto el crecimiento como la acumulación de productos (Scragg, 1992).

Aunque la mayoría de los cultivos celulares se establecen a un pH entre 5,5 y 6,0 se debe tener en cuenta que el mismo cambia durante el curso del cultivo. Estos cambios

pueden afectar la producción de metabolitos, como se demuestra en la conversión de triptofano en triptofol, en donde la cantidad de producto a pH 6,3 constante es el doble que a pH variable y la síntesis se inhibe totalmente si el pH decae a 4,8 (Veliky, 1977; Robert *et al.*, 1991).

### 5.2.3. Balance de los reguladores de crecimiento

Los regímenes hormonales estipulados en los protocolos de cultivo *in vitro* dan cuenta únicamente de la concentración hormonal agregada al medio, sin considerar el nivel hormonal propio de la célula y si los reguladores de crecimiento pudieron ser procesados por las células en estudio. Además, es posible que se genere un control por retroalimentación negativa sobre el nivel endógeno de los reguladores de crecimiento inducido por las sustancias agregadas y que exista un arrastre celular o del medio de los tratamientos anteriores. Es factible que estos aspectos sean la fuente de todas las aparentes contradicciones que se generan al tratar de explicar los efectos de los reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro*.

De todos modos, el tipo y los niveles de reguladores de crecimiento utilizados ejercen importantes efectos sobre el crecimiento y la productividad de metabolitos de plantas cultivadas *in vitro*. En general, los niveles hormonales que producen altas tasas de crecimiento no inducen la acumulación de cantidades significativas de metabolitos secundarios. Además, se ha observado que los tratamientos que estimulan la diferenciación estructural, es decir formación de brotes y de raíces desde callos, también cambian el perfil bioquímico. Es así que la regeneración de raíces en callos de algunas especies vegetales como *Hyoscyamus niger* y *Scopolia parviflora* se acompaña con un incremento de la producción de alcaloides (Yeoman *et al.*, 1990). Por otro lado, la adición de 2,4-D al medio de cultivo deprime la acumulación de alcaloides indólicos en *Catharanthus roseus*, mientras que el AIA aumenta la producción y el ANA estimula tanto la acumulación de alcaloides como la división celular (Fowler & Stafford, 1992). Además, en *Macuna pruriens* la producción de L-DOPA es estimulada por cantidades relativamente altas de 2,4-D (Brain, 1976).

### 5.2.4. Elicitación

La elicitación consiste en inducir la biosíntesis de metabolitos por exposición de los cultivos a moléculas capaces de causarle una situación de estrés. Esta presencia determina la expresión de genes asociados con las enzimas catalizadoras de diferentes vías metabólicas (Roberts & Shuler, 1997). Los elicitores se agrupan en dos clases: bióticos y abióticos. Entre los elicitores bióticos se encuentran micelios y componentes de

la pared celular de hongos, polisacáridos, glucanos, glucoproteínas y ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Los elicitores abióticos más conocidos como agentes de estrés incluyen a la radiación ultravioleta, las sales de metales pesados, los herbicidas y el estrés osmótico. (Ertola *et al.*, 1994).

Una de las ventajas de los tratamientos de elicitación es que no se requiere la transferencia de la biomasa a un medio de producción y que generalmente generan respuestas rápidas. La desventaja es que la producción, en general, no es sostenible en el tiempo (Di Cosmo & Misawa, 1995).

Existe una gran especificidad en la interacción de especie vegetal-elicitor, lo que implica que debe seleccionarse el tipo de elicitor para cada cultivo, el momento de agregarlo y la concentración para obtener la mejor respuesta (Paniego, 1995).

En cuanto al mecanismo de elicitación se ha observado que se produjo una rápida acumulación de ácido jasmónico y su metil éster cuando suspensiones celulares de *Rauwolfia canescens* y *Eschscholtzia californica* fueron tratadas con un elicitor fúngico. Estos y otros experimentos demuestran que el metil jasmonato forma parte de la vía de transducción de señales en algunos procesos de elicitación (Roberts & Shuler, 1997).

### **5.2.5. Adición de precursores**

Es posible incrementar la biosíntesis de un metabolito específico incorporando al cultivo un precursor de su vía sintética (Di Cosmo & Towers, 1984). Por ejemplo, adicionando aminoácidos se puede estimular la síntesis de alcaloides del tropano e indólicos (Di Cosmo & Misawa, 1995); el agregado de colesterol duplica la producción de diosgenina por cultivos de *Dioscorea deltoidea* y la productividad en serotonina de *Peganum harmala* se centuplica por el agregado de triptamina (Fowler & Stafford, 1992).

Para usar precursores se debe considerar el tiempo de adición al cultivo, su toxicidad y costo. Además es importante mencionar que la utilización de precursores distantes del producto en la vía metabólica puede tener pequeño o nulo efecto en el rendimiento final (Ertola *et al.*, 1994).

### **5.2.6. Biotransformaciones**

Las células vegetales en cultivo *in vitro* pueden biotransformar un determinado sustrato en un producto deseable. Los compuestos químicos que se transforman son variables e incluyen alcaloides, esteroides, cumarinas y terpenoides que pueden ser oxidados, reducidos, metilados, acetilados y/o esterificados, entre otras reacciones. Los productos no necesariamente tienen que ser los intermediarios naturales en el metabolismo vegetal (Williams & Mavituna, 1992).

Las biotransformaciones por cultivo de tejidos vegetales son procesos comercialmente muy prometedores, pero lo costoso de algunos precursores limita su aplicación. Resultan atractivos sobre todo si la transformación no puede realizarse por síntesis química o por microorganismos (Williams & Mavituna, 1992; Di Cosmo & Misawa, 1995).

Algunos ejemplos de biotransformaciones lo constituyen la producción de arbutina (agente depigmentante de la piel) resultante de la transformación de hidroquinona por células de *Catharanthus roseus* en medio líquido (Yokoyama & Yanagi, 1991), la producción de L-DOPA utilizando L-tirosina por células de *Mucuna pruriens* inmovilizadas en alginato y la hidroxilación de digitoxigenina a periplogenina por células inmovilizadas de *Daucus carota* (Williams & Mavituna, 1992).

### **5.2.7. Manipulación genética: ingeniería metabólica**

La ingeniería metabólica se presenta como una estrategia promisorio para la producción de metabolitos elaborados por plantas difíciles de cultivar o de distribución geográfica restringida, como así también para sustancias que se producen en bajas concentraciones. En estos casos la ingeniería genética se utiliza para introducir un gen clave de la vía biosintética de interés en la especie en estudio (Verpoorte *et al.*, 1998).

La metodología usada para incrementar la producción de metabolitos puede consistir en inducir la sobreexpresión de determinados genes o en bloquear vías metabólicas secundarias no deseadas mediante tecnología antisentido. Sin embargo estas técnicas no siempre aumentan el contenido de principios activos debido a que ello depende de regulaciones en toda la vía metabólica (Giulietti & Ertola, 1999).

La ingeniería metabólica ha sido aplicada para modificar el color de las flores (Verpoorte *et al.*, 1998), mejorar la calidad nutricional del arroz que biosintetice provitamina A (Ye *et al.*, 2000) y producir alcaloides del tropano (Robins *et al.*, 1994), entre otros usos.